

**MESTERSÉGES NITROGÉNKÖTŐ
EGYÜTTÉLÉSEK TANULMÁNYOZÁSA *IN VITRO*
SZAMÓCA – BAKTÉRIUM ASSZOCIÁCIÓBAN ÉS
EGYSEJTŰ ZÖLDALGA – BAKTÉRIUM – GOMBA
MODELLRENDSZERBEN**

Készítette: Lőrincz Zsanett

Témavezető: Dr. Preininger Éva

Egyetemi adjunktus

ELTE Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Erdei Anna

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program

Programvezető: Dr. Szigeti Zoltán

**ELTE Növény szervezettani Tanszék
Budapest
2011**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 Nitrogénkötő szervezetek	6
2.2 Szimbiotikus növény - mikroba rendszerek	7
2.3 Asszociatív növény - baktérium együttélések	7
2.4 Alga szimbiózisok	9
2.5 A nitrogénkötő szervezetek hatása a gazdanövényre	10
2.5.1 Fitohormonok	10
2.5.2 Az <i>Azotobacter</i> ek felhasználása a mezőgazdasági gyakorlatban	10
2.5.3 Az <i>Azotobacter</i> ek egyéb pozitív hatásai	11
2.6 A biológiai nitrogénfixáció kiszélesítésének lehetőségei	11
2.6.1 A <i>nif</i> gének közvetlen bevitela a növényi genomba	12
2.6.2 A létező szimbiotikus rendszerek hatékonyságának fejlesztése	12
2.6.3 A <i>Rhizobium</i> ok gazdakörének kibővítése	13
2.6.4 Új szimbiózisok létrehozása	14
2.6.4.1 A baktériumok megtelepítése a növények gyökereiben és hajtásaiban különböző módszerekkel	14
2.6.4.2 A baktériumok megtelepítése a teljes növényben in vitro módszerekkel	16
2.6.4.2.1 Intracelluláris endoszimbiózisok létrehozása a baktériumok közvetlen bevitelével növényi protoplasztokba (endocitobiózis)	16
2.6.4.2.2 Intercelluláris endoszimbiózisok létrehozása a növényi szöveten belüli baktérium megtelepítéssel (exocitobiózis)	17
2.7 Mesterségesen létrehozott alga szimbiózisok	19
2.8 Génpuska és a génbelövéses módszer	19
2.9 <i>Azotobacter</i> ek általános jellemzése	20
2.10 A növényregeneráció	22
2.11 A <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> általános jellemzése	24
2.12 A nitrogénhiány hatása a növények fotoszintézisére	28
2.12.1 A gerontoplasztisz	29
2.13 A nitrogénhiány okozta „kisárgulás” egysejtű algáknál	31
2.13.1 A pigmenttartalom változása	31
2.13.2 Pigment-protein komplexek arányainak változása	31
2.13.3 Ultrastrukturális változások	32
2.14 A nitrogén visszapótlás hatása („visszazöldítés” folyamata)	34
2.14.1 A visszazöldülés folyamata magasabbrendű növényeknél	34
2.14.2 A visszazöldülés folyamata algáknál	34
3. CÉLKITŰZÉSEK	36
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
4.1 A szimbiózis partnerei	38
4.1.1 A diazotróf baktérium partner	38
4.1.1.1 <i>Azotobacter</i> ek fenntartása	38
4.1.2 Növényi objektum	38
4.1.3 Alga törzs	39
4.1.3.1. Az algatörzs fenntartása	40
4.1.4. Gomba törzs fenntartása	40
4.1.5. A hármas asszociáció fenntartása	40

4.2. A szövettenyésztés körülményei és a tápközegek	40
4.2.1 A mikroszaporítás körülményei	40
4.2.2 A mikroszaporításhoz használt táptalaj	40
4.2.3 A növényregenerációhoz használt tápközeg	41
4.3. Génpuskával végzett vizsgálatok	41
4.3.1 Baktériumsejtek belövése a számóca szöveteibe	41
4.4. A baktériumok kimutatása a növény szövetéből	41
4.4.1 Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok	41
4.4.2 Fluoreszcens mikroszkópia	42
4.5. A növényregeneráció vizsgálata scanning elektronmikroszkóppal	42
4.6 A belövés okozta sérülések nyomon követése scanning elektronmikroszkópiával	42
4.7. Nitrogén megvonásos kísérletek	42
4.8. Nitrogén visszapótlásos kísérletek	43
4.9. Pigmentkivonás és klorofilltartalom meghatározás <i>Chlamydomonas</i> sejtekből és a hármasszociáció tenyészeiből	43
4.10. A pigmentek emissziós spektrumának meghatározása	43
4.11. Légzés intenzitás és fotoszintetikus aktivitás (oxigéntermelés) mérése	44
4.12. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	44
4.13. A szimbiózis partnerek által kibocsátott aminosavak meghatározása	45
4.14 DNS izolálás, amplifikálás és szekvenálás	45
5. EREDMÉNYEK	46
5.1 <i>Fragaria x ananassa</i> – <i>Azotobacter vinelandii</i> asszociáció létrehozása és vizsgálata ..	46
5.1.1 Baktériumsejtek belövése a növényi szövetekbe	46
5.1.2. A belövés okozta sérülések nyomon követése scanning elektronmikroszkóppal ..	47
5.1.3. A növényregeneráció vizsgálata	49
5.1.4. A green fluorescent protein gént tartalmazó baktériumok kimutatása a belőtt célszövetekben	52
5.1.4.1. A baktériumok kimutatása fluoreszcens mikroszkóppal	52
5.2. Alga – baktérium – gomba asszociáció vizsgálata	56
5.2.1. A <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> fotoszintetikus apparátusának szerveződése és működése nitrogén elvonás és visszapótlás hatására	57
5.2.1.1. Algasejtek degradációja nitrogénmentes táptalajon („sárgulás” folyamata) ...	57
5.2.1.1.1. Az algák klorofilltartalmának és fotoszintetikus oxigéntermelésének meghatározása	58
5.2.1.1.2. A klorofill-protein komplexek vizsgálata kisárguló alga tenyészetekben ..	59
5.2.1.1.3. Az algasejtek ultrastrukturális változásai	60
5.2.1.2. A nitrogénmentes táptalajon kisárgult alga tenyészetek vizsgálata nitrogéntartalmú közegre való visszaoltás után („visszazöldülés” folyamata)	62
5.2.1.2.1. Az algák klorofilltartalmának és fotoszintetikus oxigéntermelésének meghatározása	62
5.2.1.2.2. A klorofill-protein komplexek vizsgálata a kisárgult alga tenyészetek nitrogén tartalmú közegre való átoltása után	64
5.2.1.2.3. Nitrogéntartalmú közegre helyezett tenyészetek ultrastrukturájának vizsgálata	64
5.2.2. Alga – baktérium – gomba asszociáció vizsgálata	66
5.2.2.1. Mikroszkópos vizsgálatok	66
5.2.2.2. Klorofilltartalom és fotoszintetikus oxigéntermelés	69
5.2.2.3. Az algák klorofill-protein komplexek vizsgálat a hármasszimbiozisban ..	70
5.2.2.4. Aminosav analízis	70
5.2.2.5. Az asszociáció partnereinek kimutatása PCR technikával	72

6. DISZKUSSZIÓ	74
6.1 <i>Fragaria x ananassa</i> – <i>Azotobacter vinelandii</i> asszociáció létrehozása és vizsgálata ..	74
6.2 A <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> fotoszintetikus apparátusának szerveződése és működése nitrogén elvonás és visszapótlás hatására.....	78
6.3 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> – <i>Azotobacter vinelandii</i> – <i>Alternaria infectoria</i> hármas asszociáció vizsgálata.....	82
7. ÖSSZEFOGLALÁS	86
8. SUMMARY	87
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	88
10. IRODALMI HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	89

1. BEVEZETÉS

A mennyiségi élelmiszerellátás biztonságának megteremtésében az intenzív növénytermesztés játszik kulcsszerepet. Ennek célja a termésátlagok folyamatos növelése, amit elsősorban a nitrogén limitál (Vance és Graham, 1995). A mezőgazdasági gyakorlat a megnövekedett nitrogénigényt műtrágyával pótolja (Shantharam és Mattoo, 1997). A fokozott nitrogénműtrágya felhasználás az elmúlt évtizedekben valóban jelentős termésátlag növekedést eredményezett az egész világon, de az évek során a növekedés üteme fokozatosan lelassult mind a fejlett, mind a fejlődő országokban (Tilman és mti, 2002). A fosszilis tüzelőanyagok árának növekedésével folyamatosan emelkedik a mezőgazdaságban használt termékek, különösen a nitrogénműtrágyák ára. Ezek ipari előállítására a Harber-Bosch eljárás rendkívül energiaigényes folyamat.

A több évtizedes korlátlan mértékű műtrágya kijuttatás jelentősen hozzájárult a környezetszennyezéshez is. A talajba kijuttatott nitrogénmennyiségnek legjobb esetben is csak a felét veszi fel a növény, a maradék feleslegben a közvetlen környezetet szennyezi. Az egyre fokozódó műtrágya-felhasználás során óriási mennyiségű nitrát mosódik a talajba és a talajvizekbe, amely a folyók és tavak eutrofizációjához vezethet (Bohloul és mti, 1992). Az ivóvízbe jutó nitrát az emberi szervezetbe kerülve a májban nitráttá redukálódhat, ami egyrészt toxikus, másrészt az emberi szervezetben rákkeltő vegyületté alakulhat. A NO_3 denitrifikálása során keletkező nitrogén-oxidok üvegházhatású gázok, melyek az ózonréteg stabilitását veszélyeztetik (Keeney, 1982).

Mindezek után érthető, hogy mind gazdasági, mind környezetvédelmi okokból napjaink mezőgazdaságából egyre inkább kiszorulnak a műtrágyák. Az intenzív növénytermesztés azonban elképzelhetetlen pótlólagos nitrogén adagolása nélkül, ezért a gazdaságilag fontos növények nitrogénigényét más forrásból próbálják kielégíteni. Legkézenfekvőbb megoldás erre a biológiai nitrogénfixáció hasznosítása.

A légköri nitrogénkötésre képes szervezetek prokarióták (Balandreau 1983). A prokarióták által megkötött nitrogén a növények számára csak úgy hasznosulhat, ha a két szervezet között szorosabb vagy lazább kapcsolat (szimbiózis vagy asszociáció) jön létre (Kneip és mti, 2007). Annak ellenére, hogy a légköri nitrogén megkötése jelentős mértékben biológiai úton történik, mégsem hasznosul teljes mértékben a mezőgazdaságban, mivel az evolúció során kialakult szoros növény-mikroba kapcsolatok csupán a gazdaságilag fontos növények szűk körére jellemzők.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szimbiózis olyan kölcsönös előnyökön alapuló együttélés két vagy több eltérő fajhoz tartozó egyed, vagy populáció között, amely az adott élőhelyen hatékonyabb gyarapodást biztosít, mint az a partnerekre külön-külön jellemző lenne. Ez a kapcsolat az evolúció során jön létre, és kiegyensúlyozott körülmények között működőképes. A kooperatív kapcsolat alapja alapvetően metabolikus és/vagy genetikai. A partnerek együttműködése csak kiegyensúlyozott körülmények között lehet tartós és stabil. A stabilizáció olyan mértékű lehet, hogy az együttműködő partnerek egyedül, egymástól függetlenül már nem is tudnak élni. A környezet drasztikus megváltozása azonban az együttműködő partnerek szakításához vezethet. Ez új partneri kapcsolat kialakítását vonhatja maga után, de végső soron a partnerek kipusztulását is eredményezheti.

Szimbiózisban a partnerek új metabolikus képességekhez jutnak azáltal, hogy fontos metabolikus folyamatok kiegészítik egymást. Így nagyszámú jelentős szimbiózis alapja a fotoszintézis és a légköri nitrogénkötés összekapcsolódása, amely a biológiai, környezeti jelentőségén túl, nagy gazdasági haszonnal is jár (Paracer és Ahmadjian, 2000). Ilyen metabolikus kapcsolat a légköri nitrogénkötő baktériumok és a fotoszintetizáló növények között jól ismert (Reinhold-Hurek és Hurek, 1998; Kneip és mti, 2007).

2.1 Nitrogénkötő szervezetek

A légköri nitrogénkötésre képes szervezetek prokarióták (Balandreau, 1983; Young 1992; Schmid és Hartmann, 2007). Elterjedésüket tekintve gyakorlatilag mindenhol megtalálhatók a Földön, a sarkköröktől az Egyenlítőig valamennyi éghajlati zónában. Legnagyobb részét talajokban élnek, de előfordulnak folyókban, tavakban, tengerekben, sőt hőforrásokban is (LaRoche és Breitbarth, 2005).

A nitrogénkötéshez szükséges energiaigényüket kielégíthetik autotróf szervezetekként a napfényenergia közvetlen felhasználásával (cianobaktériumok), hidrogént és széndioxidot hasznosítva (*Arthrobacter*) valamint heterotróf módon redukált szénforrásokon élve (*Azotobacter*, *Azospirillum*).

A nitrogénkötő mikroorganizmusok 2 nagy csoportra oszthatók: a szabadon élő vagy asszociatív valamint a szorosabb szimbiózisban élő szervezetekre. A szimbiionták nitrogénfixációjuk során az energiaforrást és speciális tápanyagszükségeiteket tekintve a

gazdaszervezettől függenek. A szabadon élő, szaprofita, szerves energiaforrásra szoruló szervezetek csak közvetve függenek a növényektől. A teljes biológiai nitrogénfixáció (170 millió tonna/év) 70%-át a szimbiotikus, 30%-át a szabadon és asszociációban élő nitrogénkötők adják (Paul, 1988).

2.2 Szimbiotikus növény - mikroba rendszerek

1. táblázat: Különböző típusú szimbiózisok

Baktérium nemzetségek	A szimbiózis növénypartnerei	Hivatkozások
Rhizobiumok: Rhizobium, Sinorhizobium Azorhizobium, Mesorhizobium	Caesalpinoideae, Mimosoideae, Papilionoideae	Delwiche, 1970; Faria és mti, 1989; Moreira és mti, 2006
Sugárgombák: Frankia	Casuarina, Alnus, Eleagnus, Hippophæe, Myrica, Ceanothus	Peoples és Craswell, 1992; Benson és Clawson, 2000
Cianobaktériumok: Azolla Nostoc	Azolla, Cycas, Macrozamia, Gunnera	Quispel, 1991; Lechno-Yossef és Nierzwicki-Bauer, 2002

- A *Rhizobium*ok esetében az együttélés során egy igen fejlett, új struktúra: a gyökérgümő alakult ki, amely gyakorlatilag egy új szervnek tekinthető. Itt élnek a szimbionta baktériumok (Franssen és mti, 1992, Deakin és Broughton, 2009).

- A *Frankia* sugárgombával alkotott szimbiózisokban a növény szintén gümőket fejleszt, de ezek az előbbivel ellentétben módosult oldalgyökerek. (Hirsch és mti, 1997).

- A kékalga szimbiózisok esetében a mikroszimbionták nem okoznak a gümőképzéshez hasonló morfológiai változásokat a gazdaszervezetben. A kékalgák a gazdanövény intercellulárisaiban élnek, kivéve a *Gunnera* esetében, ahol a *Nostoc* a sejteken belül él a hajtáscsúcs régióban (Chiu és mti, 2005).

2.3 Asszociatív növény - baktérium együttélések

Az előzőekben említett szorosan együttélő szimbiózisok mellett jelentős szerepet töltenek be a lazább, ún. asszociatív együttélések. Ezekben az esetekben a baktériumpartner

gazdaspecifikussága sokkal tágabb, és, bár nitrogénfixációs aktivitásukban nem veszik fel a versenyt a hatékony szimbiózisokkal, jelentős mértékben hozzájárulhatnak a növény nitrogénellátásához. A csoporton belül elméletileg megkülönböztethetők szabadon élő és a növényekkel lazább-szorosabb asszociációt alkotó baktériumok, de mivel nem mindig egyszerű elkülöníteni a két társaság nitrogénkötését, ezért a 2. táblázatban közösen kerülnek bemutatásra.

2. táblázat: Növény – diazotróf baktérium asszociációk (a táblázat folytatása a következő oldalon látható)

Baktérium nemzetségek	Az asszociáció növénypartnerei		Hivatkozások
	Baktériumokkal lazább és szorosabb asszociációkat alkotó növények	Diazotróf baktériumokat a sejtközötti tereiben hordozó növények	
<i>Acetobacter</i>		cukornád* **,	Döbereiner és mti, 1988
<i>Agromonas</i>	rizs		Ohta és Hattori, 1983
<i>Alcaligenes</i>	rizs	rizs	You és Zhou, 1989
<i>Azoarcus</i>		<i>Leptochloa fusca</i> (kallar-fű)*	Reinhold-Hurek és mti, 1993
<i>Azomonas</i>		<i>Sarracenia**</i>	Prankevicus és Cameron, 1989
<i>Azospirillum</i>	búza, rizs, cukornád, kukorica, <i>Sorghum</i> , <i>Cynodon dactylon</i>	búza*, kukorica*, cukornád*, paradicsom*,	Baldani és Döbereiner, 1980; Scotti és mti, 1993; Baldani és mti, 1986; Patriquin és Döbereiner, 1978;; Xie és Yokota, 2005
<i>Azotobacter</i>	cukornád, rizs, kukorica, <i>Paspalum</i> <i>notatum</i> (szoros asszociáció)	<i>Sarracenia**</i> , <i>Vanda*</i> **	Purchase, 1980; Döbereiner és Day, 1976; Martinez-Toledo és mti,1985; Prankevicus és Cameron, 1989; Dighe és mti., 1986
<i>Bacillus</i>	kukorica		Berge és mti, 1991
<i>Beijerinia</i>	cukornád, rizs		Döbereiner,1961
<i>Clostridium</i>	tölgy		Jones és Bangs, 1985

<i>Derxia</i>	cukornád		Purchase, 1980
<i>Enterobacter</i>	cukornád, rizs, kukorica, tölgy		Purchase, 1980; Döbereiner és Day, 1976; Ladha és mti, 1983; Jones és Bangs, 1985
<i>Erwinia</i>	cukornád		Purchase, 1980; Döbereiner és Day, 1976
<i>Flavobacterium</i>	rizs		Bally et al., 1983
<i>Herbaspirillum</i>	rizs	cukornád*, **, bab*	James, 2000, Döbereiner és mti, 1994; Valverde és mti, 2003
<i>Klebsiella</i>	cukornád, rizs, kukorica, tölgy		Purchase, 1980; Döbereiner és Day, 1976; Yoo és mti, 1986;
<i>Pseudomonas</i>	rizs		Barraquio és mti, 1983

* diazotróf baktériumok a gyökér szövetei között fordulnak elő

** diazotróf baktériumok a hajtás szövetei között fordulnak elő

2.4 Alga szimbiózisok

A természetben előforduló számtalan alacsonyabbrendű szimbiózis közül csak az alga szimbiózisokat emelem ki külön, mert a dolgozatom egyik részében mesterséges alga szimbiózisok létrehozását és jellemzését mutatom be.

Az algák körében is elterjedek a heterotróf baktériumokkal alkotott szimbiotikus kapcsolatok. Watanabe és mti (2005) *Chlorella sorokiana* laboratóriumi tenyésztését vizsgálva négy baktérium és egy gombatorzset izoláltak. Megállapították, hogy a partnerektől szeparáltan tenyésztve az alga vitalitása csökkent.

Az algák nem csak nitogénkötő baktériumokkal kooperálhatnak, ők maguk is lehetnek más élőlények szimbionta partnerei. Legismertebb példa erre a *Chlorella* nemzetség tagjai között előforduló *Chlorella-Paramecium* (Summerer és mti, 2007) valamint a *Chlorella* – *Hidra* szimbiózisok (Rahat és Reich, 1986).

Az alga szimbiózisok közismert képviselői a zuzmók. A zuzmók két vagy három szervezet, gomba (mikobionta) és fotoszintetizáló alga (fotobionta) szimbiózisai, ez azonban

csak a 19. század vége óta ismert tény, Schwendener német mikológus (1867) kutatásai alapján. Az együttélés egy speciális testszerveződés, a tallusz kialakulását eredményezi. Ezzel együtt a szimbióták anyagcseréje is megváltozik az együttélés során, sőt speciális vegyületeket is szintetizálnak, melyek csak szimbiózisban jellemzők a partnerekre (Honegger, 1991). Mintegy 15.000 zuzmófajt ismerünk, ez a nagy szám arra utal, hogy a szimbiózisnak ez a típusa sikeresnek bizonyult.

2.5 A nitrogénkötő szervezetek hatása a gazdanövényre

2.5.1 Fitohormonok

A növény - mikroba együttéléseknél a növény elsősorban a nitrogénfixáció eredményeként és termékeként kibocsátott különböző nitrogéntartalmú szerves vegyületeket, főleg aminosavakat hasznosítja (Karube és mti, 1981). A diazotróf partner azonban gyakran más, a növényi növekedést befolyásoló hatást is gyakorol a gazdaszervezetre. Több fontos nitrogénkötő baktériumról kimutatták, hogy növekedési hormonokat termel (Frugier és mti, 2008). A *Rhizobium*ok fertőzési folyamatában fontos szerepük van a kibocsátott citokinineknek és auxinoknak (Hirsch és mti, 1997; Mathesius, 2008). Az *Azotobacter*ek tiszta tenyészetében auxin (IAA) (Garcia-Bilbao és mti 1987) és citokinin (Taller és Wong, 1989) termelést mutattak ki.

A növények tápanyagellátását segíthetik a baktériumok által termelt sziderofórok, ezek a kelátképzők, melyek a nehezen hozzáférhető elemeket, a vasat (Shah és mti, 1992) vagy a foszfort (Kumar és mti, 2001, de Freitas, 2000) oldott formává alakítva, könnyen felvehetővé teszik.

2.5.2 Az *Azotobacter*ek felhasználása a mezőgazdasági gyakorlatban

A mezőgazdasági gyakorlatban az *Azotobacter*ek legáltalánosabb felhasználási területe a talajinokulálás. A mérsékelt égövben természetesen elsősorban a gabonafélékre, így búzára (Timsina és Connor, 2001), rozsra, kukoricára (Martinez-Toledo és mti, 1988), és cukorrépára gyakorolt hatását mérték. A trópusokon a legfontosabb célnövény a cukornád és a gyapot (Kennedy és mti, 2004). Az *Azotobacter*ek pozitív hatását mérték a növények fejlődési

ütemében, a termésmennyiség fokozásában (Kumar, 1994), gabonaféléknél kalászméretben, a szemek mennyiségében és minőségében (de Freitas és mti, 2000).

A talajoltáson túl gyakori kezelés a hajtásfelszínről izolált *Azotobacterek* növényekre történő kipermetézése (Chatjipavlidis és mti, 1996) is, ami gyakorlatilag lombtrágyázásnak tekinthető.

2.5.3 Az *Azotobacterek* egyéb pozitív hatásai

Az előzőekben említett általános pozitív hatásokon túl jelentős az is, hogy ezen baktériumok olyan anyagokat is termelnek és bocsátanak ki, amelyek megakadályozzák egyes fitopatogén mikrobák felszaporodását.

Cellulóz-bontó (Abd-Alla és mti, 1992) valamint lignin-bontó (Zhang és mti, 2004) aktivitást mutattak ki *Azotobacterek*ben, amely tulajdonsága felhasználhatóvá teszi a szerves hulladékok komposztálásában. Gyakran alkalmazzák cellulóz-bontó (pl *Trichoderma harzianum*) vagy lignocellulóz bontó (pl *Cyathus certoreus*) gombákkal együttesen is, amikor a baktériumok a lebontáshoz szükséges nitrogént biztosítják (Halsall, 1993). Szennyvizek tisztításában is jó eredményeket értek el, *A. vinelandii*-val történő inokulálás után 5 nap elteltével a toxikus anyagok 90%-át lebontották a baktériumok (Ehaliotis és mti, 1999, Kargi és Ozmiçi, 2004).

2.6 A biológiai nitrogénfixáció kiszélesítésének lehetőségei

A 70-es évek energiaválságának hatására széleskörű kutatások indultak világszerte, s ennek köszönhetően mára jelentős mértékben gyarapodtak ismereteink a szimbiotikus és aszimbiotikus nitrogénkötő rendszerekkel kapcsolatban, de a gyakorlati felhasználást illetően máig sem hoztak átütő sikert (Hardy, 1993). A 90-es években még inkább körvonalazódott a biológiai nitrogénkötésre irányuló folytatódó és fokozott kutatások szükségessége, hiszen tudjuk, hogy az ún. fenntartható mezőgazdaság ma már elképzelhetetlen a műtrágyák biológiailag fixált nitrogénre történő lecserélése nélkül (Hardy és mti, 1995).

Az előzőekben ismertetett természetes rendszerek igazolják, hogy a növényekkel szorosabb-lazább kapcsolatban élő diazotróf mikroorganizmusok különböző mértékben ugyan, de hozzájárulhatnak a gazdaszervezet nitrogénigényének kielégítéséhez. Ahhoz azonban, hogy a gazdaságilag fontos növények is a lehető legjobb mértékben kihasználják a

biológiai nitrogénkötés lehetőségét, a már létező szimbiózisok fejlesztése valamint a nitrogénkötés képességének megtelepítése szükséges.

A biológiai nitrogénkötés kiszélesítésének lehetséges megoldásai a következők:

- A *nif* gének bevitelle a növényi genomba
- A meglévő szimbiózisok hatékonyabbá tétele
- A *Rhizobium*ok gazdakörének kiszélesítése
- Mesterséges szimbiózisok létrehozása

2.6.1 A *nif* gének közvetlen bevitelle a növényi genomba

A legkézenfekvőbb megoldást az jelentené, ha a nitrogénkötésért felelős *nif* géneket beépítenék a haszonnövények genomjába. Ez a géncsoport azonban rendkívül összetett. *Klebsiella*-ban kb 21 gént azonosítottak, amelyek nagy része megtalálható más diazotróf szervezetekben is, így *Rhizobium*-ban, *Bradyrhizobium*-ban, *Frankia*-ban, *Anabena*-ban és *Azospirillum*-ban (Long, 1989). Dixon és Postgate (1972) a teljes géncsoportot átvitték *Klebsiella pneumoniae*-ból *E. coli*-ba, ezzel egy teljesen új, transzgénikus nitrogénkötő baktériumot hozva létre, de ez a két szervezet nagyon közeli rokonságban áll egymással. Távolabbi rokonságban álló nemzetségek között hasonló sikereket még nem tudtak elérni. A több mint 30 éve tartó kutatások eddig sajnos kevés eredményt hoztak. Dowson-Day és mti (1991) a *nif* gének közül kettőt be tudtak építeni dohány kloroplasztiszba, de a génexpresszió mértéke rendkívül alacsony volt.

2.6.2 A létező szimbiotikus rendszerek hatékonyságának fejlesztése

Mivel a nitrogénkötő növényi sejt létrehozása ma még csak nagyon távoli cél, realisabb, ha figyelmünket a már létező szimbiotikus rendszerek jobb megismerésére és hatékonyabbá tételére összpontosítjuk. Többen próbálkoztak a gazdasági szempontból legjelentősebb *Rhizobium* – Leguminosae szimbiózis fejlesztésével. Bár laboratóriumi körülmények között a gazdanövényhez gondosan megválasztott baktérium törzsszel rendkívül jó hatásfokú szimbiózisok hozhatók létre, ugyanezek a partnerek sokkal gyengébb eredményt mutatnak szabadföldi kísérletekben, még akkor is, ha ugyanabba a talajba inokulálják vissza,

amelyből izolálták (Shantharam és Mattoo, 1997). Ennek legfőbb oka, hogy az inokulumként használt szelektált törzsnek versenyeznie kell a talajban lévő “bennszülött” populációval, amely számbeli fölényének és egységes eloszlásának köszönhetően általában elnyomja az inokulum törzset (Vance és Graham, 1995).

Brockwell és mti (1982) a következőkben foglalják össze a jó inokulum törzs tulajdonságait: 1) versenyképes legyen, 2) hatékonyan kösse a légköri nitrogént különböző környezeti feltételek mellett, 3) mobilis legyen és hatékonyan kolonizálja a talajt, 4) perzisztens legyen, 5) a kedvezőtlen körülményeket is túlélje, 6) a tárolás során megőrizze állandóságát, 7) tolerálja az alacsony talaj pH-t és 8) ne álljon le a gümőképzés és a N_2 kötés, ha a talaj nitrogént tartalmaz.

Molekuláris módszerekkel még fokozható lehetne a *Rhizobium* törzsek hatékonysága, ha képesek lennének genetikailag manipulált, fokozott nitrogénfixációs képességű törzseket létrehozni. Éppen ezért az utóbbi években egyre több kísérlet irányul a szimbiózisban részt vevő gének pontosabb megismerésére mind a növény, mind a baktérium partner szempontjából. Ma már tudjuk, hogy a baktériumok nitrogén fixációért felelős génjei plazmidokon találhatóak, a különböző *Rhizobium* törzsek laterális géntranszferrel átadhatják őket egymásnak (van Berkum és mti, 2003). A noduláció genetikai háttere is tisztázódni látszik az utóbbi évek kutatásai alapján (Pacios-Bras és mti, 2002, Markmann és Parniske, 2008; Herder és Parniske, 2009; Maekawa és mti, 2009). Suzuki és mti (2008) *Lotus japonicus* β -1,3-glükánáz génjét blokkolva intenzívebb gümőképződést értek el, miáltal a nitrogénfixációs aktivitás is drasztikusan megemelkedett.

2.6.3 A *Rhizobium*ok gazdakörének kibővítése

A gyökérgümők kialakulása egy különböző fenotípusos lépésekből álló bonyolult folyamat, amelynek minden lépése a baktérium és a gazdanövény génjeinek aktivitásától függ, és bármely stádiumban megszakadhat, ha nincs kompatibilitás a két szervezet között.

A *Rhizobium*okban található ún. *nod* gének transzkripciója elengedhetetlen a fertőzés korai szakaszában (Laguerre és mti, 2001). Ezek a különböző törzsek esetében erős homológiát mutatnak, a törzsek közt kicserélhetők anélkül, hogy módosulna a gazdaspecifikitásuk (Gallon és Chaplin, 1987). A gazdanövények felismerésében a flavonoidok a meghatározó faktorok. Az eredendően csak a gazdanövény gyökérexudátumában lévő flavonoidok hatására aktiválódó *nod* D gén módosításával viszont elérhető volt, hogy

valamennyi *nod* operon aktiválódjon a flavonoidok kölcsönhatása nélkül is (Spaink és mti, 1989). Ezek a manipulált vonalak kiterjedtebb gazdaspecifitást mutattak. *Lotus japonicus nfr1* és *nfr5*, a Nod faktor receptorért felelős génjeit expresszáltatták *Medicago truncatula*-ban és *Lotus filicaulis*-ban, ennek hatására gümőképződést figyeltek meg a gyökerükön, az egyébként erősen gazdaspecifikus *Mesorhizobium loti* - amely a *L. japonicus* diazotróf partnere – kolonizációjának eredményeként (Radutoiu és mti, 2007). Ezek a kísérletek is még csak a pillangósvirágúak családján belüli gazdagspecifitás bővítést célozták.

A baktériumok kötődését a gyökerekhez a növényi lektinek biztosítják. Ezek a fehérjemolekulák speciális kötéseket képeznek a baktériumok felszíni poliszacharidjaival. Sreevidya és mti (2005) borsó lectin génjét hordozó transzgénikus rizs gyökerét inokulálták *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* és *Bradyrhizobium japonicum* törzsekkel. A baktériumok kolonizálták a gyökerek felszínét, a gyökérszőrökön aggregálódtak.

Leszögezhetjük, hogy a növény számára a légköri nitrogén sikeres és hatékony felhasználása kizárólag endoszimbionta rendszerekben valósulhat meg. A szimbionta nitrogénkötés előfeltételei - a metabolikus szubsztrátok megbízható ellátása a gazdaszervezet fotoszintézise által, ami elegendő energiát és redukzív körülményeket biztosít, a magas oxigénszint elleni védelem, a nitrogénkötés termékeinek elszállítása a gazdaszervezetbe, a membránrendszer kialakulása a gazdaszervezet és a szimbionta partner közötti kétirányú transzportfolyamatokhoz valamint védelem a környezetben előforduló kompetitív és antagonista baktériumok ellen - csak ebben az együttélési formában teljesíthetők (Quispel, 1991).

2.6.4 Új szimbiozisos létrehozása

2.6.4.1 A baktériumok megtelepítése a növények gyökereiben és hajtásaiban különböző módszerekkel

Kennedy és Tchan (1992) sejtfalbontó enzimek segítségével próbálták meg bejuttatni a *Rhizobium*okat a növényi szövetbe, és sikeres eredményeket értek el pillangós és nem pillangós növényeknél is, beleértve a gabonaféléket is. Al Mallah és mti (1989; 1990) az enzimatis sejtfalbontást PEG (polietilén glikol) kezeléssel kombinálták rizs és repce csíranövényeknél. Ez elősegítette a baktériumok bejutását, bár nitrogenáz aktivitást csak nagyon csekély mértékben tudtak detektálni.

Az egyetlen nem pillangós növényt - a *Parasponia*-t - fertőző *Bradyrhizobium parasponium* képes volt a repcét is fertőzni enzimatisus előkezelés nélkül (Cocking és mti, 1990). A keletkező gümők rendkívül változatosak voltak; egyesek vöröses pigmentációt mutattak, utalva az esetleges leghemoglobin termelésre.

A 80-as évek elejétől Nie és mti több cikket is közöltek kínai folyóiratokban a 2,4-D (2,4-diklórfenoxi ecetsav) gümőindukáló hatásáról több növény esetében is (Nie, 1983). Az indukált gümőszerű struktúrákat para-noduloknak nevezték el (Kennedy és mti, 1990).

A *Rhizobium* nemzetségen belül különleges helyet foglal el a szabadon élő, nitrogénkötésre is képes *Azorhizobium caulinodans*, amely a trópusi *Sesbania rostrata* hajtásgümőiben él (Dreyfus és mti, 1988). Chen és mti (1992) arról számoltak be, hogy búzán a 2,4-D által indukált gyökér paranodulokban az *A. caulinodans* detektálható C_2H_2 redukciós aktivitást mutatott, de ez rendkívül csekély mértékű volt. Webster és mti (1997) aszeptikusan nevelt rizs és búza növényeket fertőztek *Azorhizobium caulinodans*-al mindenfajta kiegészítő kezelés nélkül, és nagy mértékű, 80% feletti kolonizációt tapasztaltak. A baktériumok az oldalgyökerek eredési pontjánál jutottak be a gyökérszővetbe, és a kortexen belül nagy, zsebszerű sejtközzötti üregekben helyezkedtek el. Acetilénredukciót csak szukcinát jelenlétében tudtak mérni, ami valószínűleg arra vezethető vissza, hogy az adott táptalajnál a szénforrás lehetett a nitrogénkötés limitáló faktora.

A *Rhizobium*okon kívül szabadon élő baktériumokkal, legfőképp *Azospirillum*okkal is inokuláltak 2,4-D-vel kezelt növényeket. A paranodulok az oldalgyökerek eredési pontján fejlődtek (Sriskandarajah és mti, 1993). A 2,4-D hatása komplex, mert egyrészt rengeteg oldalgyökér-kezdeményt indukál, másrészt ezek a gyökériniciálisok nem fejlődnek ki rendszeren, ez okozza a kerekded, gümőszerű formát (Kennedy és mti, 1997). A paranodulok módosult oldalgyökerek, amelyek a gyökér kortexhez hasonlóan tartalék tápanyagot tartalmaznak, és kialakulásukat, fejlődésüket nem csak a 2,4-D, hanem a mikroorganizmusok is befolyásolják.

A paranodulok indukálására vonatkozó legtöbb kísérletet búzán végezték (Christansen-Weniger, 1998). Az oxigénszint csökkentésével lehetővé vált a paranodulokon belül és a rhizoszférában elhelyezkedő baktériumok nitrogénáz aktivitásának elkülönítése (Tchan és mti, 1991). Mind a kolonizáció, mind az acetilénredukció mértéke tovább növelhető más szintetikus auxin (pl naftilecetsav vagy indolecetsav) párhuzamos adagolásával (Sriskandarajah és mti, 1993). Katupitiya és mti (1995) *lacZ* riportergén segítségével követték nyomon az *Azospirillum*ok jelenlétét, bár esetükben inkább a gyökérfelszínhez tapadtak csak a baktériumok. Ezzel ellentétben Christansen-Weniger és Vanderleyden (1994) kísérletében

az *Azospirillum*ok intracellulárisan kolonizálták a paranodulokat. A baktériumok nagy számban helyezkedtek el az intakt sejtek citoplazmájában.

Baby és munkatársai (2002) tea növény kalluszba juttattak be *Azospirillum*okat a gyökérfejlődés stádiumában. A kifejlődött növények intenzívebb növekedést mutattak.

2.6.4.2 A baktériumok megtelepítése a teljes növényben in vitro módszerekkel

Már régóta felmerült a kutatókban az az igény, hogy a diazotróf szervezeteket ne csak a gyökérszövet tartalmazza, hanem a hatékonyság fokozása érdekében a teljes növényben sikerüljön megtelepíteni. A növényi szövettenyészési technikák fejlődésével megnyílt a lehetőség erre. A baktériumok növényen belüli megtelepítésének két formája lehetséges:

- Intracelluláris endoszimbiózisok létrehozása a baktériumok közvetlen bevitelével növényi protoplasztokba
- Intercelluláris endoszimbiózisok létrehozása a növényi szöveten belüli baktérium megtelepítéssel

2.6.4.2.1 Intracelluláris endoszimbiózisok létrehozása a baktériumok közvetlen bevitelével növényi protoplasztokba (endocitobiózis)

A protoplaszt technika fejlődése tette lehetővé a nitrogénkötő baktériumok bejuttatását a falától megfosztott, plazmalemmával határolt növényi sejtbe (endocitobiotikus endoszimbiózis). A módszer elvi lehetőségét egyrészt az az elmélet támasztja alá, mely szerint egyes eukariota sejtorganellek prokariota eredetűek (Margulis, 1981), másrészt az a tény, hogy a természetben igen elterjedtek, főleg az egysejtűeknél, a működő endoszimbiózisok.

Valamennyi leírt kísérlet polietilén glikol (PEG) kezeléssel alapult, ahol a mikroorganizmusok invaginációval jutottak be a különböző növényi protoplasztokba (Davey és Cocking, 1972). A diazotróf partner a legtöbb esetben cianobaktérium volt. A várakozások ellenére azonban ez a módszer nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, mert ugyan mikroszkóposan kimutatható volt a baktériumok jelenléte a protoplaszton belül, de csak

közvetlenül a kezelés után néhány óráig. A mai napig nem sikerült olyan növényt létrehozni, amely sejtjeiben stabilan tartalmazza a nitrogénkötő baktériumokat.

Sikeres intracelluláris endoszimbiózis létrehozásáról mindössze két esetben számoltak be. Giles és Whitehead (1976) a mikorrhiza gomba *Rhizopogon* protoplasztjába építettek be sikeresen *Azotobacter vinelandii*-t. A fejlődött hifákban immunfluoreszcens technikával detektálták a bevitt *Azotobacter* L formáit, amelyeket kettős membrán vett körül. Itt acetilénredukciós aktivitást is mértek (Giles és Whitehead, 1977). Az egysejtű zöldalga *Chlamydomonas reinhardtii* sejtfaelnélküli és arginin auxotróf mutánsai PEG indukció hatására vettek fel *Azotobacter vinelandii* sejteket invaginációval vagy az algasejtek fúziójával (Nghia és mti, 1987; Gyurján és mti, 1992). A fúziós hibridek már fejlesztettek sejtfolat és nem igényeltek kiegészítő argininforrást. Az alga-baktérium tenyészetek hosszú évek óta élnek együtt nitrogén- és szénforrás nélküli tápközegen, ez detektálható elektronmikroszkóppal és acetilénredukciós teszttel is.

2.6.4.2.2 Intercelluláris endoszimbiózisok létrehozása a növényi szöveten belüli baktérium megtelepítéssel (exocitobiózis)

Mivel a magasabbrendű növények esetében kudarcot vallottak a sejten belüli baktérium megtelepítési kísérletek, realisabbá vált a sejtközötti terek meghódítása, azaz exocitobiotikus endoszimbiózisok létrehozása. A növényi szövetkultúrák és baktériumok kokultivációja, majd a növényregenerálás lehetővé teszi, hogy a nitrogénkötő baktériumok az egész növényben elterjedjenek. Az elmúlt két évtizedben több próbálkozás látott napvilágot különböző növényi és diazotróf partnerek felhasználásával.

*Rhizobium*okkal inokuláltak pillangós (Holsten és mti, 1971) és nem pillangós növényi sejttenyészeteket, nevezetesen búza és repce kalluszt (Child, 1975) valamint dohány sejtuszpenziót (Scowcroft és Gibson, 1975). A baktériumok többnyire a fejlődő kalluszok felszínén és az intercellulárisokban helyezkedtek el, a pillangós szója esetében (Holsten és mti, 1971) bejutottak egyes sejtekbe, és ott úgy felszaporodtak, hogy teljesen kiszorították a citoplazmát. Nitrogénáz aktivitást általában csupán kezdetben tudtak mérni. Ezeknek a korai kísérleteknek azonban nem volt célja a növényregeneráció, csupán a *Rhizobium*-növény kapcsolatok jobb megismerését célozták.

Cianobaktériumokkal kokultivált kallusztényszetek lassú ütemben, de növekedtek nitrogénmentes táptalajon több kísérletben is, így például ginzenggel együttnevelve (Gusev és

mti, 1980). Az egysejtű zöldalga *Chlorella* jelenléte késleltette a sárgarépa kallusz degradációját nitrogénmentes közegen (Bradley, 1980), míg az algaszuszpenzióval nem érintkező kalluszcsejteik gyorsan megbarnultak. Külön érdekessége ennek az asszociációnak, hogy nitrogénellátást egy eukarióta szervezet, a *Chlorella* biztosítja. Yamada és Sakaguchi (1980) is izoláltak nitrogénkötő *Chlorella*-t. Ezekben a kísérletekben sikerült kimutatni a cianobaktériumokat és a zöldalgákat a kalluszok sejtközötti járataiban, de nem tudtak növényt regenerálni. Gusev és mti (1986) viszont dohány-*Anabena variabilis* kevert tenyészetéből organogenezissel képesek voltak hajtásokat regeneráltatni az intercelluláris tereiben a cianobaktériumokat tartalmazó kalluszból, de nem sikerült azokat meggyökeresíteni.

A mikroaerofil *Azospirillum* is sikerrel együttnevelhető növényi szövetekkel. A növényi sejtek akkor is indukálnak nitrogénáz aktivitást, ha közvetlenül nem érintkeznek a baktériumokkal, csak a közeli közegben vannak (Child and Kurz, 1978). Az acetilénredukációs aktivitás embriogén sejtsuszpenzió leszűrt kondicionált táptalajával is kiváltható, bizonyítva ezzel, hogy az adott növények által kibocsátott metabolitok biztosítják a baktériumok szaporodását és működését (Pence és mti, 1982). Cukornád kallusz felszíni inokulálásakor az *Azospirillum*ok 18 hónapon át biztosították a szövetek lassú növekedését nitrogénmentes körülmények közt, és végig megőrizték nitrogénfixációs képességüket (Vasil és mti, 1979). A baktériumok tömegesen a laza kalluszcsejteik nagyméretű sejtközötti tereiben fordultak elő, de itt a sejtek többsége elbarnult és elhalt. Hosszútávú együttélést a tömöttebb, kis intercellulárisokat tartalmazó kalluszcsejteknél tapasztaltak, ahol az *Azospirillum*ok nem tudtak tömeges mértékben felszaporodni. A regenerálódott hajtások azonban nem tartalmazták a baktériumokat (Berg és mti, 1979).

A szabadon élő aerob nitrogénkötő baktériumok közül *Azotobacter vinelandii* adenindeficiens vonalával végeztek kísérleteket. Az inokulált és szilárd táptalajra szélesztett sárgarépa szuszpenzió kallusz kolóniákat fejlesztett nitrogénmentes táptalajon, amelyek hosszútávon megtartották növekedésüket, és nitrogénfixációs aktivitást mutattak (Carlson és Chaleff, 1974, 1975). Ez a mesterséges együttélés kölcsönös egymásrautaltságon alapult: a sárgarépa szövet redukált nitrogént kapott az *Azotobacter*ektől, amelyek viszont auxotróf adeninigényük tekintetében a sárgarépa voltak utalva. Regenerációt azonban nem sikerült indukálni az intercellulárisaikban baktériumokat tartalmazó kalluszokból. Ezt a kísérletet alapul véve sikerrel regeneráltak *Azotobacter zettuvonii* - sárgarépa kokultivált sejtsuszpenziót, ahol mind a kalluszban, mind az embriogenezissel fejlődött növényekben ki tudták mutatni a nitrogénkötő partner jelenlétét mikroszkóposan és acetilénredukációs teszttel egyaránt (Varga és mti, 1994).

2.7 Mesterségesen létrehozott alga szimbiózisok

Mióta tudják, hogy a zuzmó több élőlényből szerveződik össze, azóta próbálkoznak *in vitro* a partnerekből zuzmótelepet reszintetizálni. Kevés lichenológusnak sikerült ezt elérnie és általában nem steril körülmények között. 1990 óta öt nemzetség fajainak telepeit bírták redifferenciálódásra (Yamamoto és mtsai. 1985, 2002).

Watanabe és mti (2005) *Chlorella sorokiana* tenyésztetből izoláltak szimbionta baktérium és gombatorzseket. Ezek után az egyes partnerekkel külön – külön mesterségesen együtt tenyésztették az algát, megfigyelve, milyen kapcsolat jön létre közöttük. Önmagában egyik baktérium sem volt képes az alga szükségleteit kielégíteni, viszont két törzs kevert tenyésztete az algával tenyésztve hosszú távon is sikeresnek bizonyult, amit a tenyésztet 7 hónap után is sötétzöld színe és stabil klorofill tartalma igazolt. Szintén *C. sorokiana* – t tenyésztettek együtt egy propionsav bontó baktériummal. Ebben a mesterséges asszociációban a *Chlorella* jól tolerálta a tápközeg magas propionsav koncentrációját is (Imase és mti, 2008)

Szimbiózisban a partnerek új metabolikus képességekhez jutnak, azáltal, hogy fontos metabolikus utak kiegészítik egymást. Laboratóriumi körülmények között, nitrogén és szénforrás mentes környezetben az előbb említett metabolikus kapcsolat modellezhető. Partnerek lehetnek itt a szabadonélő, aerob nitrogénkötő baktérium, az *Azotobacter* és az intenzíven fotoszintetizáló, egysejtű zöld alga, a *Chlamydomonas* (Korányi és mti, 1993., Gyurján és mti, 1995, 1992.). A fentiekben bemutatott, a Növénysszervezettani Tanszéken létrehozott alga-baktérium modellrendszer már több éve működik. Fenntartását a partnerek által a közegbe kiválasztott molekulák biztosítják. A *Chlamydomonas* zöldalga sejtek nagy számú szénvegyületet választanak ki. Ilyenek például a különböző cukrok, α -ketosavak, glikolsav, oxálsav és piroszölősav (Allen 1956; Collins és Kalnins 1967; Vogel 1978). A baktérium a légkörből megkötött nitrogént aminosavak formájában választja ki. Ezen kívül vitaminokat és növekedési hormonokat biztosít az alga partner számára (Gonzalez-Lopez és mti, 1983; Scott 1984; Revillas és mti, 2000).

2.8 Génpuska és a génbelövéses módszer

A génpuskát ma már széles körben alkalmazzák növényi sejtekbe történő génbevétel céljából. Az eljárást Sanford és mti (1988) alkalmazták először. Az módszer lényege, hogy a

DNS-t 1-2 μm átmérőjű wolfram vagy arany részecskéhez rögzítik, majd e részecskéket nagy sebességre felgyorsítják. Amikor a hordozó részecskék eltalálják a célszövetet vagy sejteket, a rajtuk lévő DNS-t is bejuttatják a célszövetbe. A sejtek rendszerint túlélnek a beavatkozást, osztódnak, és növény regenerálható belőlük. A módszert sikeresen alkalmazták olyan növényeknél, ahol *Agrobacterium* alapú génbevitelre nem volt lehetőség. Sikeres transzformációról számoltak be egyszikűeknél, beleértve a gazdaságilag igen fontos búzát, rizst és kukoricát (Wan és Lemaux, 1994) kétszikűeknél, gombáknál, algáknál (Kindle és mti, 1989) és baktériumoknál. Állati sejteket és szöveteket is sikerült már transzformálni (Zelenin és mti, 1989).

Génbelövéshez gyakorlatilag bármilyen növényi inokulum felhasználható. Sikeresen transzformáltak embriogén sejtuszpenziókat (Sahrawat és mti, 2003) és osztódó szöveteket, merisztémákat, és belőlük transzgénikus növényt sikerült regenerálni. Sikeresen juttattak be DNS molekulát élesztő mitokondriumokba (Johnston és mti, 1988) és *Chlamydomonas* kloroplasztiszba (Boynton és mti, 1988) e módszer alkalmazásával.

A génbelövéses eljárás előnye, hogy nem igényel hosszadalmas szövettenyésztési eljárást, elméletileg minden élő szervezetbe, sejtbe bejuttatható segítségével DNS molekula. A génpuskával élő baktériumok is bejuttathatók a növényi szövetekbe, és belőlük baktériumokat tartalmazó növényt regenerálható.

Rasmussen és mti (1994) dohány és kukorica transzformálása során baktériumokat használtak mikrolövedékként. Ezeket az *Escherichia coli* és *Agrobacterium tumefaciens* sejteket azonban előzőleg fenollal kezelték, így a mikrolövedék elhalt baktériumokat tartalmazott. Hordozóként wolframot használtak. Kísérletük bizonyította, hogy biológiai részecskék alkalmasak nagy molekulású DNS célszövetbe történő bejuttatására, továbbá a transzformációs folyamat egyszerűbbé és gyorsabbá válik a DNS molekulák teljes tisztítása és izolálása nélkül.

A Növénysszervezettani Tanszéken kíséreltük meg először élő baktériumok direkt belövését növényi szövetekbe génpuska által, és belőlük sikerült növényt regenerálni. (Preininger és mti, 2001, 2003)

2.9 Azotobacterek általános jellemzése

Kísérleteink során az *Azotobacteraceae* családba tartozó diazotróf *Azotobacter vinelandii* törzzsel dolgoztunk. Az *Azotobacter* nemzetséget a századfordulón fedezték fel,

ekkor kezdték vizsgálni a növényekkel alkotott asszociációit, hogy azon növények számára is elérhetővé tegyék a szimbiózis nyújtotta előnyöket, amelyek a *Rhizobium*okkal nem tudtak kapcsolatot létrehozni (Rodelas és mtsai., 1998). Szabadon élő, Gram negatív baktériumok, melyek természetes körülmények között fellelhetők a vizekben, talajokban, a növényi rhizoszférában és az üledékekben is (Palleroni, 1984). Kolóniáik a talajokban nyálkás burokkba ágyazva fordulnak elő. Aerob szervezetek lévén oxigén jelenlétében is képesek a légköri nitrogén megkötésére. A nitrogenáz az oxigén hatására irreverzibilisen károsodik. Az enzim védelmére szolgál a nyálkaréteg, a leghemoglobin, valamint a légzési és a konformációs védelem. A légzési védelem lényege, hogy a környezet magas oxigéntartalma miatt a légzési elektrontranszport egy alternatív, nagy oxigénfogyasztással járó, de kevés energiát termelő útra terelődik. A konformációs védelem során az enzim kapcsolódik egy speciális, Fe-S-centrumot tartalmazó védő fehérjével, ezáltal irreverzibilen inaktív formába kerül (Schlessman és mtsai., 1998). Mindez lehetővé teszi, hogy működőképesek legyenek a növény fotoszintetizáló szöveiteiben is.

Szén- és energiaforrásként hasznosítani tudják a különböző cukrokat, alkoholokat, szerves savakat valamint a talajban és a bomló növényi anyagokban megtalálható fenol jellegű vegyületeket is. Aminosavak, vitaminok jelenlétét nem igénylik. Optimális növekedésükhöz általában semleges kémhatás szükséges (Rodelas és mtsai., 1998).

Az *Azotobacterek* a növényi növekedést serkentő hatású anyagokat bocsátanak ki környezetükbe (Kennedy és mtsai., 2004, Rodelas és mtsai., 1998). Ezt a hatást nem csak nitrogén tartalmú vegyületek (aminosavak, szerves savak, vitaminok) okozzák, hanem az általuk termelt növényi hormonok, elsősorban az auxinok is (Gonzales-Lopez és mti, 1991, Aquilanti és mtsai., 2004). Szén- és energiaraktározás céljából poli- β -hidroxilajsavat (PHB) halmoznak fel sejtjeikben. Ezt a vegyületet számos más baktérium is raktározza kiegyensúlyozatlan tápanyag-ellátottság, csökkent nitrogén vagy foszfáttartalom vagy a szénforrás túlsúlya esetén (Bageshwar és mtsai., 1998, Dhanasekar és mtsai., 2002).

Az *Azotobacter* nemzetség tagjai kedvezőtlen körülmények között cisztákat képeznek, melyek a magas hőmérsékletet kevésbé, de az UV sugárzást és a kiszáradást különösen jól tűrik. A ciszták külső rétege főként alginátot és lipopoliszacharidokat tartalmaz (Gaona és mtsai., 2004). A fajokra jellemző, hogy ammónia jelenlétében nitrogenáz enzimük működése feed back gátlással teljesen leáll.

2.10 A növényregeneráció

A növényi biotechnológia egyik nagy előnyét a szomatikus sejtekből kiinduló növényregeneráció jelenti. A növényregenerálás során a dedifferenciálódott szomatikus sejtekből hajtás vagy gyökér, illetve teljes növény fejlődhet. A folyamat két fejlődési útvonalon mehet végbe *in vitro* körülmények között: organogenezis és szomatikus embriogenezis által.

Az izolált növényi részek *in vitro* tenyésztése a sejt kultúrákkal kezdődött. A növényi sejtek, szövetek mesterséges, laboratóriumi körülmények között való tenyésztését 1902-ben a német Haberlandt kezdte meg. Haberlandt már az 1900-as évek elején felvetette, hogy a növényi sejtek totipotensek, azaz minden sejtjükben teljes növény regenerálható, valamint támogatta azt az elméletet, miszerint a növényi hormonok jelentős szerepet játszanak a sejtosztódás és egyedfejlődés során. Elsőként White és Nobécourt figyelt meg véletlenszerű gyökér és hajtásdifferenciálódást a tenyésztett kalluszban a múlt század harmincas éveiben. Skoog és Miller (1957) felvetette, hogy összefüggés áll fenn a növekedési hormonok, az auxin és citokinin aránya és az organogenezis között. A dohány kallusszal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a kallusztenyésztéshez szükséges optimális auxin-kinetin arány csökkentésével hajtásfejlődés, növelésével pedig gyökérfejlődés indukálható. Azóta több 100 fajnál számoltak be szomatikus embriogenezissel, ill. organogenezissel végbemenő növényregenerációról.

Hicks (1980) bizonyította, hogy az **organogenezisnek** két útja lehet *in vitro*, egyik esetben közvetve kalluszképződésen keresztül indul meg a morfogenezis, ill. közvetlenül, magukból a sejtekből is elindulhat a folyamat. Chlyah (1974) *Torenia* epidermiszsejteket vizsgálva megfigyelte, hogy a sejtosztódás egyedi sejtekben kezdődik, majd ez az aktivitás kiterjed a mellette levő két-három sejtre. Ezek a centrális sejtek folytatják az osztódást, majd a perifériális sejtek is elkezdenek osztódni, de lassabban. Kialakul a merisztemoid vagy merisztematikus centrum. A merisztemoid kezdetben apoláros, később polárossá válik, majd megjelennek a hajtás primórdiumok a szövet felszínén. Az organogenezis során végeredményben egypólusú tenyészőkúpok alakulnak, melyekből hajtások vagy gyökerek fejlődnek. Az ellentétes pólus differenciálódását általában külön táptalajon kell indukálni.

A kallusz egy heterogén, laza sejtalmaz. A merisztemoid kialakulása során a táptalajból egy irányban ható, grádiens létrehozó szignálokra reagáló sejtcsoportok elkülönülnek a többi sejtől, és bennük a randomitás helyett a sejtek fokozatosan egy irányba

rendeződnek. Az elkülönülő sejtcsoportban intenzív osztódás zajlik, és a környező hosszúkás kallusz sejtekhez képest a merisztemoidokban a sejtek izodiametrikusak és szorosan állnak. A polaritás előrehaladásával a tengely mentén megjelennek a tracheidák is.

Az organogenezis egyik fontos metabolizmusa a keményítő akkumuláció, ami már a merisztemoid iniciáció előtt megfigyelhető (Thorpe és Meier, 1972). Később a keményítő lebomlik. Az organogenezis során a légzés nagymértékben emelkedik, ami a nagy energia igényre utal. Az organogenezisben résztvevő sejtekben génexpressziós változás tapasztalható. Olyan polipeptidok képződnek, amelyek nem találhatók meg a kallusz szövetekben, és leginkább az ún. háztartási gének termékei (Bertrand-Garcia és mti, 1992).

A szomatikus embriogenezis létezését Reinert (1958) valamint Steward és mti (1958) különálló sejtekből fejlődő sárgarépa embriók teljes ontogenezisének vizsgálatával bizonyították. A 2,4-D megvonásával indukált sárgarépa embriogenezis első lépéseként a kalluszban nem embriók, hanem az organogenezishez hasonló merisztematikus központok alakultak. A szomatikus embriogenezis ezeknek a merisztematikus központoknak a felületéről indult meg. Korábban vitát képezett, hogy egy vagy több sejtől indul meg az embriogenezis. Ma az az általánosan elfogadott nézet, hogy az organogenezissel szemben egyetlen, kompetenssé vált, embrioid típusú sejtől indul meg a folyamat (Toonen és mti, 1994). A táptalajba adagolt auxin (leginkább 2,4-D) szétválasztja a válaszadó, kompetens sejteket a többi kallusz sejtől, és a hormon megvonásakor indul meg a szomatikus embriogenezis (Dudits és mti, 1991; Chen és mti, 1994). Ennek első lépése egy inekvális osztódás, amely létrehozza a kétsejtes proembriót (Mansfield és Briarty, 1991). Következő lépésben kialakul a háromsejtes T alakú, majd a nyolcsejtes proembrió. Az osztódások következtében megjelenő soksejtes gömbalakot a zigotikus embriogenezishez hasonlóan a szív- és torpedó stádiumok követik. A soksejtes gömbalakot követően az embrió bipolárossá válik, a bazális oldalon a gyökércsúcs, az ellentétes oldalon pedig a sziklevek jelennek meg. A gyökér és a hipokotil kezdemények megnyúlása eredményezi a torpedó struktúra megjelenését. A kialakult érett embrió a zigotikus embrióval ellentétben nem vonul nyugalomba, belőle hajtással és gyökérrel rendelkező növény fejlődik.

Az embriogenezisben jelentős szerepet játszanak a növényi hormonok, elsősorban az auxinok. Ahogy a korábbiakban említettük, az exogén 2,4-D a szomatikus embriogenezis induktora. Később az embriók éréséhez csökkent auxinszint szükséges (Dudits és mti, 1991). Sahrawat és Chand (2004) árpa koleoptilból regeneráltattak növényeket. Kimutatták, hogy a NAA és BA mellett néhány aminosav, mint a triptofán és a glutamin is szomatikus

embriogenezist indukálhat. Emellett különböző szénhidrátok is szerepet játszhatnak az indukcióban. Laktóz, glükóz, galaktóz, glicerol és szorbitol hatását vizsgálva megállapították, hogy leginkább a glicerol segíti elő a növényregenerációt, de jó eredményeket értek el laktóz tartalmú táptalajon is (Kayim és Koc, 2006).

Számos esetben alkalmazták sikerrel a thidiazuron vegyületet, melynek használatával a szomatikus embrio- és morfogenezis auxin igénye helyettesíthető (Murthy et al. 1998). A thidiazuron egy szintetikus citokinin, mely a hajtásnövekedést segíti elő. Növényi szövetkultúrákban lassú metabolizációja miatt folyamatos hormonellátást biztosít a regeneráció során. Singh és mti (2002) borsóban vizsgálták a thidiazuron hatását. Az alacsony koncentrációk mellett hajtások illetve leveles struktúrák fejlődtek. Magasabb koncentráció alkalmazása során szomatikus embriogenezist is megfigyeltek. Ezekből a kultúrákból teljes növényeket sikerült regenerálni.

Az organogenezis főleg a Cruciferae és a Compositae család tagjaira jellemző. A szomatikus embriogenezis főleg az Umbelliferae-re. A legjobban regenerálódóak közül a Solanaceae, Fabaceae és a Graminaceae családra mindkettő jellemző.

2.11 A *Chlamydomonas reinhardtii* általános jellemzése

A *Chlamydomonas* egysejtű zöldalga elnevezése a görög eredetű *chlamys* köpeny és *monas* egysejtű szavakból ered (Harris, 2001). Morfológiai leírása a XIX. században kezdődött. Az első genetikai tanulmányok a XX. sz. elején jelentek meg, 2003-ra pedig elkészült a teljes géntérkép (Kathir és mti, 2003). Különösen az organelláris genetika, nevezetesen a plasztiszgenetika területén került a kutatások homlokterébe.

Elsőként Pascher (1918) demonstrálta, hogy a *Chlamydomonas* faj alkalmas a genetikai vizsgálatokra, rámutatott a haploid rendszer előnyeire, melyben a meiosis összes utódsejtje kinyerhető és analizálható. Franz Moewus (1938) az 1930-as években bemutatta, hogy mutánsok izolálhatók és jellemezhetők. Az eltelt időszakban nagyszámú mutánszt állítottak elő UV- és röntgen besugárzással, valamint különböző kémiai ágensekkel.

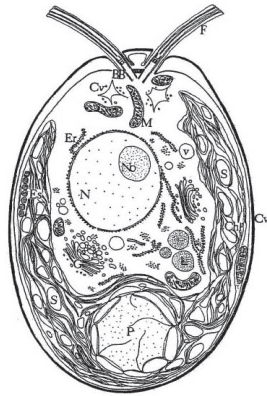
A *Chlamydomonas* a fotoszintetikus kutatások kiváló objektuma, tenyésztete fotoautotróf és heterotróf körülmények között egyaránt fenntartható. Ez utóbbi esetben a szénforrás acetát. A fotoszintetikus apparátus sötétben is kialakul. E két tulajdonsága miatt különböző, a fotoszintézisben és plasztiszszerkezetben defektes mutáns izolálható (Davies és Grossman, 1998). Elmondható, hogy az elmúlt 50 évben ez az organizmus a molekuláris

biológia különböző területeinek egyik legfontosabb modelljévé vált (Gutman és Niyogi, 2004).

A vad típusú *C. reinhardtii* sejt (1. ábra) tojásdad vagy gömb alakú, átlagosan 10 µm átmérőjű. Sejtfaa hidroxiprolinban gazdag glikoproteineket tartalmaz, melyek hasonlítanak a növényi extenzinre. Számos sejtfaahiányos mutáns törzset különítettek el. A sejtfaa mutánsok széleskörűen használhatók sejtfaaúkra illetve DNS transzformációkra (Nghia és mti, 1987; Gyurján és mti, 1992).

Két 10-12 µm hosszú pleuronematikus, izokont ostora van, melyek speciális gallér régió keresztül nyúlnak át a sejtfaalon. A *Chlamydomonas* kezdettől fogva nagyon jó modell organizmus az ostor működésének és összeszerelődésének vizsgálatára. Több olyan mutáns izoláltak, melyek az ostorok működésének különböző rendellenességeit mutatják (Hastings és mti, 1965; McVittie, 1972).

Egyetlen hatalmas, serleg alakú kloroplasztisza elfoglalja a sejt kétharmadát és részben körülvéa a haploid sejtmagot, amely 16 kromoszómát tartalmaz. A tilakoid membránok szerveződése jól elkülöníthető szorosan összetapadó és különálló régiókból áll (Goodenough és Levine, 1969). Felmerül a kérdés, hogy a *Chlamydomonas* kloroplasztiszainak keresztmetszeti képen gránumoknak látszó membránkötegeket nevezhetjük-e ténylegesen gránumoknak, vagy csak szorosan tapadó („stacking”, vagy „appressed”) membránoknak. A szakirodalomban ez is, az is előfordul, bár a szerzők inkább óvakodnak a gránum kifejezéstől. Anderson (1999) magyarázata szerint a *Chlamydomonas* tilakoidjai nagyon szabálytalanul kapcsolódnak össze és válnak szét egymástól, míg a *Characeae* családba tartozó legfejlettebb zöldalgák gránum szerkezete már nem különböztethető meg a magasabbrendű növényekétől, ezért ő csak a *Chara*-félék esetében alkalmazza a gránum kifejezést. Goodenough és Levine (1969) részletesen foglalkoztak ezzel a problémával. Szerintük a *Chlamydomonas* membránkapcsolatai jelentős mértékben különböznek a magasabbrendű növények egyforma gránumjaitól, melyekben sok tilakoid tapad össze szorosan rövid szakaszokon. Ezzel szemben a *Chlamydomonas* plasztiszaiban változó a kapcsolódó tilakoidok száma, lehet 2-10 is. Ezek hossza meglehetősen kiterjedt. Az összetapadt részek mérete nem állandó hosszabb távon, egy 4 lamella régió rövid táv után kettéválhat, egyik feléhez hamarosan kapcsolódhat egy harmadik, másik része fuzionálhat újra két, már eleve összetapadt lamellával stb.



1. ábra *Chlamydomonas reinhardtii*. (BB= bazális test, Chl= kloroplasztisz, Cv= kontraktilis vakuolum, Cw= sejtfa, Er= endoplazmatikus retikulum, Es= szemfolt, F= ostor, G= Golgi-apparátus, L= lipid test, Mi= mitokondrium, N= sejtmag, No= sejtmagvacsksa, P= pirenoid test, r= riboszómák, s= keményítő szemcse, v= vakuolum; Harris, 2001)

A kloroplasztisz lamellák közé beékelődve pirenoid testek fordulnak elő, melyek körül keményítőszemcsék helyezkednek el (Lopez-Ruiz és mti, 1985). A pirenoid test megléte, hiánya, száma és elhelyezkedése fontos faji bélyeg a hagyományos taxonómiában. Schötz és mti (1972) szerint a *Chlamydomonas* sejtben 10-15 mitokondrium található.

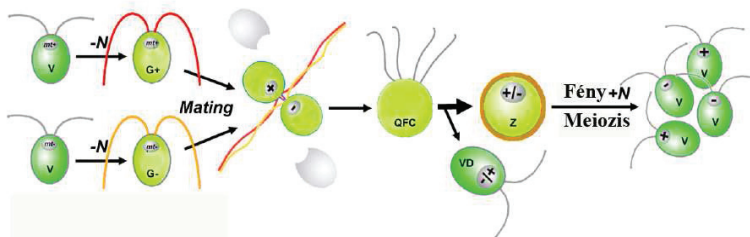
A szemfolt narancssárgának látszik fénymikroszkópban, mely magas karotinoid tartalmának köszönhető. Elektronmikroszkópos felvételeken elektrondenz régióként jelenik meg a kloroplasztisz membránja alatt a sejt középvonalában. A karotinoid tartalmú granulumokat retinalkötő rodopszin homológként (chlamyopsin) azonosították (Deininger és mti, 2000). A szemfolt feladata az „úszó” sejt orientációja a fény irányába (fototaxis).

A sejtek osztódásában, a sejciklus szabályozásában a kék fény fontos szerepet játszik (Voigt és Münzer, 1994). A fény és sötét periódusok váltakozásával a sejtosztódás szinkronizálható (Chiang és mti, 1970). A fény kapcsolatban áll a szexuális ciklussal is, a kék fény fotoreceptorok részt vesznek a gametogenezis szabályozásában (Hermann és mti, 1999).

A *Chlamydomonas* általában ivartalanul szaporodik, de ivaros szaporodásra is képes. Az ivari jelleg (mating típus) a nukleáris genomban kódolt. A mating típusok kialakulásáért (Ferris és mti, 2002; Lin és Goodenough, 2007) és a fúzióért felelős gének már ismertek

(Ferris és mti, 2005). Kedvezőtlen környezeti tényezők, elsősorban nitrogénhiány hatására különböző mating típusú (G^+ és G^-) gamétává alakulnak. Míg morfológiailag a gaméták alig különböznek a vegetatív sejtektől, biokémiai sajátságuk tekintetében az eltérések már jelentősek. A gametogenezis 16-18. órájában a citoplazma és a kloroplasztisz riboszómák jelentős degradációja figyelhető meg (Siersma és Chiang, 1971). A gaméták fuzionálnak és kialakul a diploid zigóta. Cavalier-Smith (1975) egy érdekes, új organelumot figyelt meg mindkét mating típusú gamétánál összekeverés után, de legalábbis az mt^+ típusúnál, és ezt gamoszómának nevezte el. A gamoszóma tulajdonképpen egy kopulációs tubus, ami a gaméták között kialakul, ez később kiszélesedik a gaméták összeolvadása folyamán. Azt is megfigyelte, hogy a gaméta képződés során az eltérő mating típusok összekeverése után lízissel részlegesen lebomlik a sejtfal. Fény és nitrogén jelenlétében a diploid zigóta meiotikusan osztódik, és négy haploid leánysejt keletkezik (2. ábra).

Napjainkban a *Chlamydomonas*al végzett kutatások nagy részét a molekuláris biológia területén végzik, ezért a gametogenezis genetikai háttéréről egyre több információval rendelkezünk.



2. ábra *Chlamydomonas reinhardtii* életciklusa. A kétféle mating típusú haploid sejtek (mt^+ és mt^-) mitotikusan osztódnak. Nitrogén hiány hatására (-N) gamétákká differenciálódnak (G^+ és G^-). A különböző mating típusú gaméták a flagellumok területén összekapcsolódnak. A két sejt fuzionál és egy két sejtmagot és négy ostort tartalmazó sejt jön létre, ez a prozigóta („quadriflagellated cell”= QFC). Később a magok is összeolvadnak, az ostorok lebomlanak és kialakul a zigóta (Z). A magok fúzióját a plasztiszok fúziója is követi. A zigóta nitrogén tartalmú közegen (+N) meiozison megy keresztül, mely négy haploid vegetatív sejtet eredményez. A négyostoros prozigótákból (QFC) meiosis nélkül vegetatív +/- diploidok is kialakulhatnak (Goodenough és mti, 2007).

A legtöbb vad típusú *C. reinhardtii* képes asszimilálni a nitrogént nitrát, nitrit, ammónium és egyéb kis molekulák, pl. urea, acetamid stb. formájában (Sager és Granick, 1953; Cain, 1965; Gresshoff, 1981; Pineda és mti, 1984).

A nitrogén jelenléte vagy hiánya alapvetően meghatározza a sejt felépítését és működését. Nitrogén hiányában jellemző a kloroplasztisz morfológiai megváltozása, a plazstiszban a keményítő és a lipid akkumulációja (Cavalier-Smith, 1975; Martin és Goodenough, 1975). A nitrogén elvonás egyenes következménye a sejt protein- és klorofill tartalmának, valamint az organelláris DNS és RNS szintjének csökkenése (Kates és Jones, 1964). Ez utóbbiak már nem szükségszerű velejárói a gametogenezisnek. A nitrogénelvonás finom beállításával lehetőség nyílna olyan klorotikus sejtek létrehozására is, melyek nem mennek keresztül gametogenezisen, és a fotoszintetikus apparátus különböző szinten jelentkező szétesése képezi a legfontosabb történéseket.

2.12 A nitrogénhiány hatása a növények fotoszintézisére

A nitrogénellátottság a növény fejlődésének egyik fő tényezője. A nitrogén, mint a klorofill molekula valamint a struktúr- és enzimfehérjék alkotóeleme, nélkülözhetetlen az aktív fotoszintézis és a szénhidrát termelés fenntartásához (Peoples és mti, 1980). Nitrogénhiányos környezetben a levelek sejtszáma (Lawlor és mti, 1989) és a fotoszintézis mértéke jelentősen lecsökken (Meinzer és Zhu, 1998). A nitrogénhiány csökkenti a CO₂ megkötés képességét (Terashima és Evans, 1988). Fluoreszcencia indukciós mérések alapján befolyásolja a PSII aktivitását is (Verhoeven és mti, 1997). Klorofilltartalomra számítva nő a PS II aktivitása, míg a PSI-é alig változik. Ez valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a reakciócentrumok mennyisége nem változik, az antennák mennyisége viszont lecsökken (Baszynski és mti, 1975). Csökken a klorofill és a karotinoid tartalom valamint a klorofill a/b arány (Lichtentaler, 1973; Sundqvist és mti, 1980) és ennek megfelelően a nettó fotoszintézis mértéke is (Lawlor és mti, 1989).

Nitrogéndeficiens *Lemna* növényekben a fotoszintetikus fehérjék degradálódnak és szintetizálják a gátlót. Ez vonatkozik az LHC I és LHC II proteinekre is (Rhiel és mti, 1986). Ultrastrukturális szinten megváltozik a kloroplasztiszok egyébként megnyúlt alakja, és inkább kerekdeddév válik (Doncheva és mti, 2001), a hossza ilyen módon felére csökken (Tevini, 1971). Csökken a tilakoid membránok mennyisége, és ezzel párhuzamosan megnő a plasztokintonin tartalmazó (Lichtentaler és Weinert, 1970) plasztoglobulusok mérete (Kutik és mti, 1995). A gránum szerkezete fellazul, a normális esetben szorosan kapcsolódó tilakoidok

helyenként elválnak egymástól, esetenként megduzzadnak és a kloroplasztisz szélére tolnak. Közben folyamatosan csökken a tilakoidok száma (Doncheva és mti, 2001). Végül a gránum szerkezet szétesik (Biswal és Biswal, 1988).

A plasztoglobulusok felhalmozódása a sztrómában gyakran együtt jár a tilakoid membránok elégtelen fejlődésével (Tevini és Steinmüller, 1985). Úgy gondolják, hogy a nitrogénhiányos növények plasztiszaiban a plasztoglobulusok a degradálódott tilakoid membránok hidrofób komponenseinek maradványaiból összeálló lipidcseppek (Biswal és Biswal, 1988). A nitrogénéheztetés hatására megnövekedett plasztoglobulus mennyiség tehát több lipid tárolását jelenti (Kutik és mti, 1993).

A tilakoidok lebomlása során az őket 80%-ban felépítő galaktolipidek azonban nem akumulálódnak a plasztoglobulusokban, mint a lebomlás során keletkező más lipidek (Tevini és Steinmüller, 1985). Ezek valószínűleg, mint szén- és energiaforrás használnak fel (Matile, 1992).

Plasztoglobulusok nem csupán a plasztiszon belül, hanem a citoplazmában is felhalmozódnak (Hudak, 1981). Sokáig azt gondolták, hogy ezek a lipidtestek a plasztiszon kívüli membránokból erednek. Guiaimét és mti (1999) azonban kimutatták, hogy az öregedő kloroplasztiszokból származnak, mégpedig úgy, hogy átnyomódnak a külső határolómembránon. Másrészt plasztoglobulusok tartalmaznak klorofill lebomlási termékeket is, ami plasztisz eredetüket bizonyítja. Kialakulásuk pontos mechanizmusa azonban még nem ismert.

A plasztoglobulusokon kívül a felhalmozott keményítő mennyisége is megnő a sztrómában nitrogénhiány hatására (Lichtentaler és Weinert, 1970). A keményítő felhalmozódást okozhatja az, hogy több fotoszintézis termék keletkezik, mint amennyi el tud szállítani. A csökkent ütemű kivonás szacharóz felhalmozódáshoz vezet és ez a szacharóz szintéziséért felelős enzimekre gyakorolt gátló hatás által elősegíti az újonnan megkötött szén keményítővé alakítását (Carmak és mti, 1994). A nitrogénhiányos levelekben csökken ugyan a széndioxid fixáció, de a szacharóz elszállítódás még inkább gátolt. Valószínűleg a keményítő felhalmozódása további plasztisz szerkezeti rendellenességhez vezet.

A nitrogénhiány hatására kialakult plasztiszszerkezet egyértelműen gerontoplasztisznak tekinthető.

2.12.1 A gerontoplasztisz

Először Sitte (1977) alkalmazta a gerontoplasztisz kifejezést. Természetes módon a levelek szeneszcenciája idézi elő, amikor egyes elemek, leginkább a nitrogén, kivonódnak az idősebb levelekből és a hajtáscsúcs irányába, a fejlődő magokba vagy fiatal levelekbe vándorolnak. Ilyenkor ezek a szeneszcens levelek kisárgulnak, sejtjeikben a kloroplasztiszok gerontoplasztiszokká alakulnak át, és közben az előbbiekből említett degradációs folyamatok játszódnak le. Gerontoplasztisz kizárólag kloroplasztiszból alakulhat ki. A szeneszcencia folyamán a kloroplasztisz az az organellum, ami elsőként mutat degradációs jeleket, de utolsónak marad életben, amikor a többi organellum már lebomlott (Smart, 1994). A gerontoplasztisz nem elhalt plasztisz, hiszen életképes fehérjeszintetizáló rendszere megmarad és külső membránja is megtartja szelektív transzport kapacitását (Kawakami és Watanabe, 1993). A legfontosabb bizonyíték arra, hogy nem holt organellum az, hogy képes visszaalakulni kloroplasztisszá a szeneszcens levél visszazöldítésekor (Biswal és mti, 1983; Smart, 1994). Visszaalakulása során megmarad néhány gerontoplasztiszra utaló jellegzetessége, így például a plasztoglobulusok jelenléte, ami arra utal, hogy nem propasztiszból alakult ki. A visszaalakulás is egy programozott folyamat, és így a gerontoplasztisz is megtartja genetikai potenciálját a sejtmaggal való együttműködésre, ahogy ez más plasztisztípusoknál is megfigyelhető.

A szeneszcens levelek sárgulásának oka, hogy sejtjeikben a kloroplasztiszok gerontoplasztiszokká történő átalakulása közben a tilakoidokban a pigmentek és proteinek mennyisége egymással párhuzamosan és folyamatosan csökken. Bár a proteinek és a klorofilok degradációja a karotinoidokéhoz képest gyorsabb, mindhárom komponens mennyiségi csökkenésének a kinetikája közel egyforma, ami a lebomlásuk koordinált szabályozására utal (Biswal 1995; 1997).

A kloroplasztisz gerontoplasztisszá alakulása során jelentős ultrastrukturális változások figyelhetők meg, meghatározott lépések folyamatában. Először a gránumtilakoidok elválnak egymástól és megnő az intratilkoid tér. Laza, megnyúlt lamellák keletkeznek (Matile, 1992). A lamellák további degradációjával párhuzamosan a plasztoglobulusok száma, aránya nő (Smart, 1994). A plasztoglobulusok nem csak a plasztiszban halmozódnak fel, hanem kijutnak a citoplazmába is (Hudak, 1981). A gerontoplasztiszban felhalmozódó plasztoglobulusok tartalmaznak tilakoid bomlási termékeket, mint pl fitolt a klorofillból, karotinoid észtereket, szabad karotinoidokat és xantofilokat (Steinmüller és Tevini, 1985; Biswal és Biswal, 1988).

A karotinoidok segíthetnek megőrizni a reziduális LHC stabilitását. A violaxantin és a lutein szerkezeti stabilitást biztosítanak a maradék tilakoid komplexeknek (Deo és Biswal,

2001). A plasztoglobulusok a lipidvegyületeken (karotinoidok, plasztokinon, tokoferol) (Vidi és mti, 2006) kívül számos fehérjét is tartalmaznak (Kessler és mti, 1999; Ytterberg és mti, 2006). A plasztoglobulusokat ún. félmembrán (Kessler és mti, 1999) veszi körül.

Celetkezésük során a gránumtilakoidok kanyarulataiban elválík egymástól a kettős lipidréteg, és közéjük halmozódnak fel a plasztoglobulus tárolt anyagai. Az is kiderült, hogy a félmembránnal körülvett plasztoglobulusok ilyenformán együtt maradva, egymással is és a tilakoidokkal is egy folyamatos láncolatot alkotnak (Austin és mti, 2006).

2.13 A nitrogénhiány okozta „kísárgulás” egysejtű algáknál

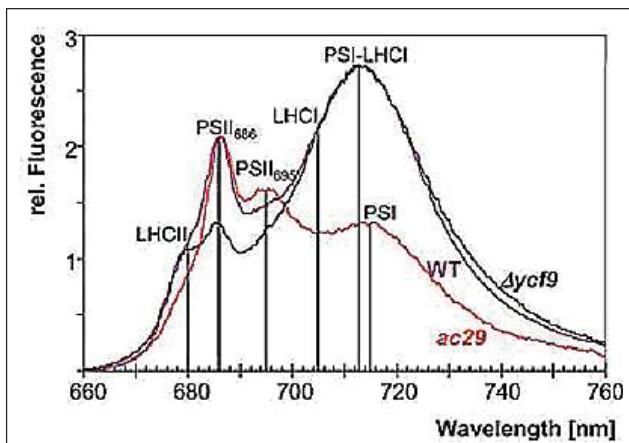
2.13.1 A pigmenttartalom változása

A növényekhez hasonló folyamatok játszódnak le az algáknál nitrogénhiányos környezetben. Grimme és Porra (1974) nitrogénmentes (de szerves szénforrás tartalmú) közegen, fényen tartva *Chlorella* tenyészetet, megállapították, hogy a 4-6 hetes sárgítás következtében a klorofilltartalom a normális zöld sejtekhez képest 1%-ra csökkent. Fotoszintetikus oxigénfejlődést egyáltalán nem tudtak detektálni. Mayer és Czygan (1969) valamint Guerin-Dumartrai (1970) vizsgálatai is a klorofilltartalom csökkenését támasztják alá. A teljesen kísárgult sejtek esetében a klorofill a/b arány Guerin-Dumartraist és mti (1970) szerint 1,6, ami hasonlít Grimme és Porra (1974) eredményeihez. Nitrogénszegény környezetben a *Chlamydomonas* sejtek klorofilltartalma nagy mértékben lecsökkent, a kontrol értékének csupán 33%-át éri el, főleg az LHC II pigmentjei degradálódtak (Plumley és Schmidt, 1989). A klorofill-b tartalom redukciója a legszembetűnőbb. Az egyedülálló acidotermofil mikroalga *Galdieria sulphuraria* esetében először a fikobiliproteinek degradálódtak, majd a klorofill és karotinoid tartalom csökkent le nyomnyi mennyiségre (Sinetova és mti, 2006).

2.13.2 Pigment-protein komplexek arányainak változása

A zöldalgák és az edényes növények 77K fluoreszcencia emissziós spektrumában általában három fő sáv található: 685, 695 és 710-735 nm-nél (Murata és mti, 1966). A két rövidebb hullámhosszú sáv nagyrészt a PSII pigmentjeinek, a hosszú hullámhosszú pedig a

PSI klorofil komplexeinek fluoreszcenciája miatt jelenik meg. A *Chlamydomonas* vad típusának fluoreszcencia emissziós spektruma a 3. ábrán látható. A 685 és 695 nm-es sávok maximuma konstans a fajok többségében, míg a PSI fluoreszcencia emissziós maximuma variál a fajok között. Nitrogénhiányos *Chlamydomonas* sejtekben a 685 nm-nél rövidebb hullámhossznál megjelenő fluoreszcencia emisszió általában a reakciócentrumoktól disszociált LHCII-nek tulajdonítható. Ezt igazolja a 77 K fluoreszcencia emissziós spektrumban egy 678 nm-es nagy váll megjelenése is (Plumley és Schmidt, 1989). A fluoreszcencia emissziós spektrumok jól mutatják a klorofil-b alacsony szintjét.



3. ábra *Chlamydomonas reinhardtii* vad típusának (WT) 77K flureszcencia emissziós spektruma (WT – lila színű spektrum) (Ossenbühl és mti, 2004)

2.13.3 Ultrastrukturális változások

A nitrogénhiány hatására a kloroplasztisz ultrastrukturája is átalakul. *Chlorella*-nál figyelték meg, hogy a tilakoidok jelentősen degradálódnak (Guerin-Dumartrai és mti, 1970) és plasztiszonkénti számuk is lecsökken, bár még 35 nap sárgítás után sem tűnnek el teljesen (Mayer és Czygan, 1969; Oshio és Hase, 1972). *Chlamydomonas* sejtekben is tapasztalták a tilakoidok mennyiségének csökkenését és a kapcsolódások redukcióját (Martin és Goodenough, 1975).

A 4-6 hét alatt teljesen kisárgult *Chlorella* sejtekben a plasztiszok nagy részét ozmiofil anyag tölti ki (Pyliotis és Goodchild, 1975), ennek jelentős része raktározott lipid. Nitrogén

deficiens közegen tartott algák lipid felhalmozását többen is kimutatták (Klyachko-Gurvich és mti, 1969). Mayer és Czygan (1969) vizsgálatai szerint, míg a lipid vakuolumok aránya növekszik, a plasztoglobulusok számában és strukturájában nem figyelhető meg változás. Oshio és Hase (1972) a plasztoglobulusok számának növekedéséről számolt be. Pohl és mti. (1970) szerint a raktározott lipid összetételét befolyásolja a közegen lévő ammónia ill. nitrát mennyisége. Alacsony nitrogéntartalom esetén palmitinsav és olajsav, magas nitrogénszintnél főként többszörösen telítetlen zsírsavak szintetizálódnak. A sztrómában nagy méretű keményítő szemcsék is találhatók, erről Zhukova és mti (1969) valamint Guérin-Dumartrait és mti (1970) számoltak be. Az acidotermofil *Galdieria sulphuraria* nitrogénéhezetése során is felhalmozódnak raktározott anyagok (Sinetova és mti, 2006). Lipid- és keményítő akkumulációja figyelhető meg nitrogén deficiens *Chlamydomonas* plasztiszában is (Cavalier-Smith, 1975; Martin és Goodenough, 1975). Érdekes megjegyezni, hogy szélsőséges hőmérséklet és az öregedés folyamata szintén jelentős lipid- és szénhidrát felhalmozódáshoz vezethet az alga sejtekben (McLean, 1968).

Pyliotis és Goodchild (1975) a magasabbrendű növények etioplasztiszaira jellemző prolamelláris testhez hasonló membrán aggregációt figyelt meg nitrogénhiányos *Chlorella* esetében.

Egyes szerzők megfigyelései szerint a nitrogénhiány a sejtfalat is érinti. Pyliotis és Goodchild (1975) nitrogénmentes közegen tartva a *Chlorella* tenyészetet, azt tapasztalta, hogy a sejtek közel 80%-a többrétű sejtfalat fejlesztett. Megfigyeléseik szerint általában 2-5 rétetű volt a sejtfal, de nem tudtak magyarázatot adni e szokatlan jelenségre. Ezzel ellentétben a sejtfal elvékonyodásáról számoltak be az acidotermofil *Galdieria sulphuraria* nitrogénéhezetése során (Sinetova és mti, 2006). Nitrogénéhezetés hatására az alga sejtek osztódóképességeket elveszítik (Guérin-Dumartrait és mti., 1970; Sinetova és mti, 2006).

Többféle algát összehasonlítva, levonható az a következtetés, hogy a nitrogénhiány okozta stresszre adott válasz hasonló minden esetben: gátlódik a sejtosztódás, degradálódik a fotoszintetikus apparátus és a raktározott anyagok felhalmozása fokozódik (Sinetova és mti, 2006).

Hasonló változások mennek végbe a magasabbrendű növények plasztiszszerkezetében a szenescencia folyamán, amikor a kloroplasztisz gerontoplasztisszá alakul (Shihira és Hase, 1964; Tevini és Steinmüller, 1985), ezért a nitrogénhiány hatására kialakult plasztisztípust az algáknál is nevezhetjük gerontoplasztisznak.

2.14 A nitrogén visszapótlás hatása („visszazöldítés” folyamata)

2.14.1 A visszazöldülés folyamata magasabbrendű növényeknél

Régóta ismert tény, hogy egyetlen szeneszcens levél kivételével eltávolítva valamennyi levelet és rügyet, visszazöldíthető a kisárgult levél (Mothes és Baudisch, 1958). A visszazöldülés folyamatát az utóbbi években úgy vizsgálják, hogy a szeneszcens levél felett dekapitálják a szárát (Zavaleta-Mancela és mti, 1999a). A visszazöldülésben, a fotoszintetikus kapacitás visszanyerésében óriási szerepe van a citokininnek, ezt több növényfajnál igazolták (Venkatarayappa és mti, 1984, Marek és Stewart, 1992). Az endogén citokinin felhalmozódik a dekapitált növény leveleiben (Wang és mti, 1977). A gerontoplasztisz kloroplasztisszá való visszaalakulását nagymértékben befolyásolja az egész levél fiziológiai állapota. A szeneszcens levél sokkal érzékenyebbé válik a mikrobiális fertőzésekre és a szabadgyökökre. Ez gondot okozhat a gerontoplasztiszban tárolt metabolitok hasznosításában. A szeneszcens levelekben ezért hatékony védekező mechanizmus alakul ki, ami megnövekedett kataláz és egyéb patogén támadás elleni gének expressziójának növekedésével igazolható (Dangl és mti, 2000).

Dekapitált *Nicotiana rustica* hajtás esetében a visszazöldülés a sejtmegnyúlásnak köszönhetően a levél vastagodását eredményezi. A visszaalakult kloroplasztiszok felismerhetően gerontoplasztiszból differenciálódnak, a plasztoglobulusok és a keményítőszemcsék igazolják ezt, melyek a visszazöldült levelek kloroplasztiszjaiban ugyan jóval kisebb mértékben, de megmaradnak. Természetesen a kloroplasztiszra jellemző tilakoid- és gránumszerkezet kialakul. A visszazöldült levelekben nem található sem proplasztisz, sem osztódó kloroplasztisz. A szeneszcens levelekben lecsökken a plasztiszok mérete és száma, ez nem nő meg újra a visszazöldülés folyamán. A fenti tények igazolják, hogy a visszazöldített levelekben a kloroplasztiszok mindenképpen a gerontoplasztiszok redifferenciálódásával alakulnak ki, nem pedig újonnan proplasztiszokból (Zavaleta-Mancela és mti, 1999b).

2.14.2 A visszazöldülés folyamata algáknál

Visszazöldítés alatt algák esetében a nitrogénhiányos vagy nitrogénmentes táptalajon rövidebb-hosszabb ideig történő nevelés után újra normál nitrogéntartalmú közegre való visszahelyezését kell érteni.

A nemzetközi szakirodalomban sokkal kevesebbet foglalkoztak az algák visszazöldítésével, mint a nitrogénhiányos környezetben történő kisárgításával illetve gamétaképzésével. A fellelhető adatok zöme *Chlorella*-ra vonatkozik.

Nitrogén jelenlétében szinte azonnal elindul a klorofill szintézise (Mayer és Czygan, 1969), és a visszazöldülés 24 óra alatt végbemegy. A folyamat során a kezdeti nagyon alacsony, 1,8 klorofill a/b arány megnő 3,3-ra, ami intenzív klorofill szintézisre utal (Grimme és Porra, 1974). *Chlamydomonas* esetében hirtelen megnő a nitrogén- illetve szabad aminosav tartalom. Megindul a fehérjeszintézis és ezzel párhuzamosan — a *Chlorellával* ellentétben — a klorofill a/b arány csökken, ami az LHC II gyarapodására utal, jóllehet az apoproteinjai később szintetizálódnak (Plumley és Schmidt, 1989). A nitrogénéheztetés során felhalmozódott másodlagos karotinoidok (astaxantin-szerű) fokozatosan lebomlanak (Mayer és Czygan, 1969).

Nitrogéntartalmú közegre helyezve a kisárgult *Chlorella* tenyészetet, 4 óra múlva mérhető fotoszintetikus oxigénfejlődés, a 4. és 6. óra között pedig kifejezetten jelentős növekedés mutatható ki, és 16 óra alatt eléri a maximumot. A légzési aktivitás végig magas (Grimme és Porra, 1974).

A kloroplasztisz strukturális változásának plasztikusságával többen foglalkoztak *Chlorella*-nál (Oh-Hama és mti, 1965; Guérin-Dumartrait és mti, 1970). Újra nitrogéntartalmú közegre helyezve a kisárgult tenyészetet, elindul a tilakoidok szintézise (Mayer és Czygan, 1969). A lamellák rövid idő után fúzionálnak és kötegelődnek (Pyliotis és Goodchild, 1975). A plasztiszokban a lamellák eléri a *Chlorella*-ra jellemző (Reger és Krauss, 1970) normál gránumszerű struktúrát.

A visszazöldítés 6. órájában megfigyelhető, hogy a lipid cseppek által elfoglalt területek aránya csökken, a keményítő mennyisége azonban változatlan marad. 24 óra után további lipid csökkenés figyelhető meg, a keményítőtartalom továbbra is változatlan. (Pyliotis és Goodchild, 1975). Végül eltűnnek a lipidvakuólumok (Mayer és Czygan, 1969).

A nitrogénéheztetés hatására osztódóképességüket is elvesztett sejtek újra osztódóképessé válnak (Guérin-Dumartrait és mti., 1970).

Végso soron a visszazöldítés folyamata során a kisárgult algák visszanyerik eredeti zöld színüket, miközben újrászerveződik fotoszintetikus apparátusuk, visszaépülnek a tilakoidok és a növényeknél leírt gerontoplasztiszokból újra kloroplasztiszok alakulnak ki.

3. CÉLKITÚZÉSEK

Munkánk során két különböző, mesterségesen létrehozott nitrogénkötő asszociációval dolgoztunk. Mindkét rendszerben a nitrogénkötő partner az *Azotobacter vinelandii*. Az egyik egy kéttagú asszociáció, ahol a növényi partner egy magasabbrendű növény, a szamóca. A másik egy hármas szimbiózis, melyben a baktériumon kívül egysejtű zöldalga (*Chlamydomonas*), mint növényi partner és gomba (*Alternaria*) van jelen.

A magasabbrendű növényekkel létrehozott asszociációk vizsgálata során azonban számos probléma merül fel. A baktériumokat a szövetekben hordozó növények *in vitro* tenyésztői nem tarthatók fenn teljesen nitrogénmentes tápközegen, ezért nehezen kimutatható, mennyi nitrogénforrást szolgáltat a növény számára baktériumpartnerre. A két szervezet által egymás anyagcseréjére gyakorolt hatás vizsgálata szintén nehézségekbe ütközik. Ezért a Tanszéken már korábban létrehozott egysejtű modell rendszerrel is végeztünk vizsgálatokat.

Munkánk fő feladatául így egyrészt szamóca (*Fragaria x ananassa*) – nitrogénkötő *Azotobacter* asszociációk mesterséges létrehozását és vizsgálatát, valamint a Tanszéken korábban létrehozott *Chlamydomonas reinhardtii* – *Azotobacter vinelandii* – *Alternaria* szimbiózis vizsgálatát jelöltük meg. Ennek érdekében az alábbi célokat tűztük ki:

I. Szamóca – *Azotobacter* asszociáció vizsgálata során

1. *gfp* gént tartalmazó *Azotobacter vinelandii* sejtek belövése génpuskával szamóca *in vitro* leveleibe és regenerálódó hajtáscsúcsaiba
2. A belőtt inokulumokból történő növényregeneráció módjának lépésről lépésre történő megfigyelése scanning elektronmikroszkópiával
3. A *gfp* gént tartalmazó baktériumok sorsának nyomon követése a belövés után a regenerálódó növényekben, különböző módszerekkel:
 - fluoreszcens mikroszkóppal
 - laser scanning mikroszkóppal
 - scanning elektron mikroszkóppal

II. *Chlamydomonas* – *Azotobacter* – *Alternaria* szimbiózis vizsgálata során:

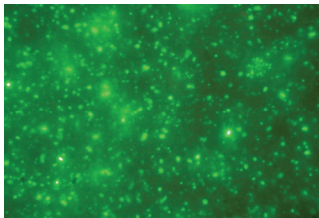
1. *Chlamydomonas reinhardtii* degradációjának vizsgálata nitrogén megvonás hatására
 - klorofill tartalom meghatározása
 - a pigmentek emissziós spektrumának meghatározása
 - légzés intenzitás és fotoszintetikus aktivitás (oxigéntermelés) mérése
 - transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok
2. *Chlamydomonas reinhardtii* sejtek regenerációjának vizsgálata nitrogén visszapótlás hatására
 - klorofill tartalom meghatározása
 - a pigmentek emissziós spektrumának meghatározása
 - légzés intenzitás és fotoszintetikus aktivitás (oxigéntermelés) mérése
 - transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok
3. A *hármas* asszociáció fotoszintetikus paramétereinek vizsgálata
 - klorofill tartalom meghatározása
 - a pigmentek emissziós spektrumának meghatározása
 - légzés intenzitás és fotoszintetikus aktivitás (oxigéntermelés) mérése
4. A *hármas* asszociáció vizsgálata transzmissziós elektron mikroszkóppal
5. A szimbiózis partnerek által kibocsátott aminosavak meghatározása
6. A szimbiózis partnerek jelenlétének kimutatása PCR technikával
7. A gomba partner azonosítása DNS szekvenálással

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A szimbiózis partnerei

4.1.1 A diazotróf baktérium partner

Kísérleteinkbe az *Azotobacter vinelandii* [DSM 85] törzset vontuk be, melynek genomjába egy korábbi együttműködés keretében a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban zölden fluoreszkáló *gfp* gént tartalmazó plazmidot építettek be (4. ábra). Az *Azotobacter vinelandii* emissziós maximuma 509,5 nm-nél, gerjesztési maximuma pedig 388 nm-nél van.



4. ábra *gfp* gént hordozó *Azotobacter vinelandii*

4.1.1.1 Azotobacterek fenntartása

A baktérium tenyészeteket 7-es pH mellett, nitrogénmentes, 2% glükózt tartalmazó tápközegen (Newton és mti, 1953) tartottuk fenn 25 °C-on, szilárd agar lemezen (1,8% agar).

4.1.2. Növényi objektum

Növényi objektumnak a szamócat (*Fragaria x ananassa*) választottuk. Ennek fő oka, hogy évelő és vegetatíven szaporítható (5. ábra). A fajra jellemző, hogy - bár fajtánként

változó mértékben - viszonylag könnyen kezelhető az *in vitro* rendszere, mind a kalluszképzés, növényregeneráció, mind a mikroszaporítás szempontjából.

A kísérletbe vont fajta: Fertődi F5

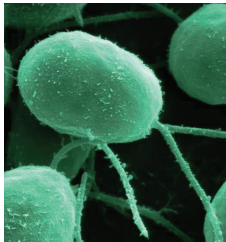
A kiindulási növényanyagok a Gyümölcs-és Dísznövény Kutató Fejlesztő Vállalat Fertődi Állomásáról származnak.



5. ábra Szamóca (*Fragaria x ananassa*)

4.1.3 Alga törzs

Kísérleteinkhez az egysejtű zöldalga *Chlamydomonas reinhardtii* 187-es vad típusú törzsét használtuk fel (6. ábra).



6. ábra *Chlamydomonas reinhardtii* scanning elektronmikroszkópos képe (Forrás: http://oldgoforsys.mpimp-golm.mpg.de/images/chlamydomonas6-2_green.jpg; 2008.06.11.)

4.1.3.1. Az algatörzs fenntartása

Az alga tenyészet fenntartása 23°C-on, szilárd TAP tápközegen (Sager és Granick, 1953) történt havonkénti passzálással. Naponta 16 óra megvilágítást alkalmaztunk Tungsram F29 Warm White (40W) típusú fénycsővel, melynek foton flux denzitása $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ volt.

4.1.4. Gomba törzs fenntartása

Az *Alternaria infectoria* törzset a hármas szimbiózisból izoláltuk. A törzs fenntartása MMN közegen (Kovács és mti, 2003) (pH= 5) történt.

4.1.5. A hármas asszociáció fenntartása

A hármas asszociáció fenntartása szén- és nitrogénmentes 'Az' tápközegen (Newton és mti, 1953) történt három havonkénti passzálással.

4.2. A szövettenyésztés körülményei és a tápközegek

4.2.1 A mikroszaporítás körülményei

A mikroszaporított növényeket 100 ml ürtartalmú üvegedényekben neveltük. A hajtáskultúrákat 23 °C-on, napi 16/8 órás, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPF mesterséges megvilágítás mellett (Tungsram F29, meleg fehér fénycsövek) tartottuk fenn. A tenyészeteket 6 hetenként passzáltuk friss táptalajra.

4.2.2 A mikroszaporításhoz használt táptalaj

A mikroszaporításhoz használt tápközeg receptjét magunk állítottuk össze: MS alapú táptalajt (Murashige és Skoog, 1962) egészítettünk ki 100 mg/l inozit, 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l GA₃, 0,5 mg/l IBA hormonokkal.

4.2.3 A növényregenerációhoz használt tápközeg

A növényregenerációhoz használt tápközeg receptjét magunk állítottuk össze: MS alapú táptalajt (Murashige és Skoog, 1962) egészítettünk ki 3 mg/l, tidiazuron és 0,1 mg/l IBA hormonokkal.

4.3. Génpuskával végzett vizsgálatok

4.3.1 Baktériumsejtek belövése a szamóca szövetébe

Kétféle célszövetet használtunk a baktériumok belövésehez. Mikroszaporított növények fiatal leveleit vágtuk le, és a belövés előtti napon kallusz indukciós-regenerációs táptalajra helyeztük. Másrészt kallusz indukciós táptalajon fejlődött regenerálódó hajtáscsúcsokat használtunk.

A kísérletbe vitt *Azotobacter vinelandii* 1-3 μm átmérőjű. Mikrohordozóként ezért 3 μm átmérőjű wolfram szemcséket (Biorad M25) használtunk. Annyi baktériumot adtunk a keverékhez, hogy az kb 109 sejt/ml koncentrációban tartalmazza a baktériumsejteket. A keverékhez 9% spermidint adtunk. A szuszpenzióból lövésenként 7,5 μl -t cseppentettünk a műanyag makrohordozóra. A lövéseket nagy nyomással (30 bar), nitrogéngáz meghajtású Genebooster® génpuskával végeztük. A lövési távolság kb 15 cm volt.

4.4. A baktériumok kimutatása a növény szövetéből

4.4.1 Scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok

A levéldarabokat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk 2 órán keresztül, 70 mM K-Na foszfát puffert (pH=7.2) használva. A növekvő koncentrációjú etanolsoros víztelenítés után a mintákat amil-acetátba helyeztük, majd kritikus pont szárítással kiszáritottuk. A növényi részeket aranybevonattal láttuk el, majd 15 kV gyorsító feszültség mellett, Hitachi S-2360 N scanning elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4.4.2. Fluoreszcens mikroszkópia

A *gfp* gént tartalmazó baktériumokat fluoreszcens mikroszkóppal is kimutattuk a növényi szövetekből. A zöld levelekben található klorofill ill. a másodlagos anyagcseretermékek erős autofluoreszcenciát mutatnak, ami zavarólag hat a fluoreszcencia vizsgálatoknál. Ezeket az autofluoreszcens anyagokat alkohollal kioldottuk a levelekből. A leveleket ezt követően bioliztikus kezelésnek vetettük alá. A belőtt levelek vizsgálata Olympus BH2-RFCA típusú epifluoreszcens mikroszkóppal és Zeiss Axiovert 135 TV konfokális lézer scanning mikroszkóppal történt. Munkánk során 488 nm gerjesztést valamint 515-525 nm közötti és 560 nm feletti szűrőket használtunk. A felvételek 40x és 100x-os nagyítással, 2 μ és 1 μ résszélességgel készültek.

4.5. A növényregeneráció vizsgálata scanning elektronmikroszkóppal

Irodalmi adatok alapján a szamóca organogenezissel (Nehra és mti, 1989) és embriogenezissel (Wang és mti, 1984) egyaránt regenerálódik. Ennek vizsgálatára a levelek regenerációs tápközegre helyezése után naponta mintát vettünk és fixáló oldatba helyeztük. A minták előkészítése megegyezett az előzőekben leírtakkal (4.5.1 fejezet).

4.6 A belövés okozta sérülések nyomon követése scanning elektronmikroszkópiával

A regenerációs tápközegre helyezett steril, fiatal szamóca leveleket a 4.4.1 fejezetben leírtak szerint baktériumokkal belőttük. A belövés okozta sérülések szöveti regenerációját, a felszíni baktériumok további sorsát közel egy hónapig (29 nap) követtük nyomon scanning elektronmikroszkópiával. Kezdetben a bioliztikus kezelés után néhány óránként, majd később naponként vettünk mintát. A minták előkészítése megegyezett az előzőekben leírtakkal (4.5.1 fejezet).

4.7. Nitrogén megvonásos kísérletek

Az alगतörzset a fenntartó táptalajról nitrogén mentes szilárd TAP közegre helyeztük át. A fenntartás egyéb körülményei megegyeztek az 4.1.1. pontban leírtakkal. A különböző kísérletekhez az alábbi időpontokban vettünk mintát:

- klorofilltartalom meghatározás: 0., 1., 3., 5., 8., 12., 15. és 18. napokon,

- pigmentek abszorpciós és emissziós spektrumának meghatározása: 0., 1., 2., 4., 8., 12., 15., 22. és 37. napokon,
- oxigéntermelés meghatározása: 1., 3., 5., 7., 9., 15. és 21. napokon,
- elektronmikroszkópos vizsgálatok: 0., 2., 5., 8., 13., 15., 24. és 82. napokon.

4.8. Nitrogén visszapótlásos kísérletek

A tenyészeteket nitrogénmentes közegről visszahelyeztük nitrogént tartalmazó fenntartó TAP közegre és az 4.1.1. pontban leírt körülmények között neveltük tovább. A különböző kísérletekhez az alábbi időpontokban vettünk mintát:

- klorofilltartalom meghatározás: 0., 1., 3., 6., 9., 15., 24., 48. és 96. órákban,
- pigmentek abszorpciós és emissziós spektrumának meghatározása: 0., 1., 3., 6., 9., 24., 48., 72. és 120. órákban,
- oxigéntermelés meghatározása: 0., 1., 2., 4., 6., 10., 15., 24., 48. és 96. órákban,
- elektronmikroszkópos vizsgálatok: 0., 5., 14., 24., 48., 78. és 120. órákban.

4.9. Pigmentkivonás és klorofilltartalom meghatározás *Chlamydomonas* sejtekből és a hármas asszociáció tenyészeiteiből

Szilárd TAP közegen tartott *Chlamydomonas*, illetve a nitrogénmentes TAP közegen tartott asszociáció tenészeiteiből 10 mg-ot elszuszpendáltuk 0,5 ml 0,1M-os NH_4OH oldatban, majd 4,5 ml jégáld 80%-os acetont adtunk hozzá, és 10 percig jégen inkubáltuk. Inkubálás után 10 percig centrifugáltuk 10°C-on 12000 g-n, majd abszorpciót mértünk a felülúszóból 645 és 663 nm-en. A mérést kétszer ismételtük meg.

A klorofilltartalmat Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Spectrometer típusú spektrofotométerrel, Porra és mti (1989) alapján határoztuk meg.

4.10. A pigmentek emissziós spektrumának meghatározása

Szilárd tápközegen tartott *Chlamydomonas* kultúrából 1,5mg-ot 1ml folyékony TAP és 4ml desztillált víz oldatába helyeztük, majd mágneses keverővel néhány percig kevertettük. A kapott homogén oldatból 300µl-nyit azonnal fluoreszcencia mérőcsövekbe pipettáltunk, és

folyékony nitrogénbe állítottuk. Minden tenyészetből 3 mintát vettünk és minden mintáról 3-3 spektrumot mértünk, amiket a fluoriméter átlagolt. Az így előkészített minta pigmentjeinek fluoreszcencia emissziós spektrumát Fluoromax-3 Jobin Yvon, Horiba típusú fluoriméterrel határoztuk meg. A gerjesztési rést 2 nm-re, az emissziós rést 5 nm-re állítottuk be. Az emissziós spektrum mérése során 440 nm-es hullámhosszon, 580 és 780 nm között vettük fel az eredményeket. Az integrációs idő 0.1 s volt. Az adatgyűjtés 0,5 nm-enként történt.

A számítógépes spektrumanalízis SPSERV V.3.11 programmal (Bagyinka Csaba, MTA SZBK Biofizikai Intézet) történt. A spektrumokon öt pontos lineáris simítást és alapvonal korrekciót végeztünk. A spektrumok integráljukra normálása úgy történt, hogy a spektrumok intenzitását elosztottuk a totál integráljukkal.

4.11. Légzés intenzitás és fotoszintetikus aktivitás (oxigéntermelés) mérése

Szilárd közegen nevelt alga valamint szimbiózis tenyészetekből vett mintákat 50 nM-os Tricin-NaOH (pH=7.8) izoláló pufferben (400 nM szorbitol, 10 nM NaCl) szuszpendáltuk fel. A minták légzés intenzitását és fotoszintetikus oxigéntermelését Hansatech Oxy Lab típusú oxigén elektróddal mértük ($\mu\text{mol O}_2/\text{perc}/\text{ml}$), majd a nettó fotoszintetikus oxigéntermelést $\mu\text{g O}_2/\text{g}$ friss tömeg/perce vonatkoztatva adtuk meg. A mérést kétszer ismételtük meg. A mintákat $900 \mu\text{mol foton}/\text{m}^2.\text{sec}$ fényintenzitással világítottuk meg.

4.12. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálathoz műgyantába ágyaztuk a mintákat. Az alga sejteket valamint a szimbiózis tenyészeteket glutáraldehidben (2%, 3 óra) és ozmium-tetroxidban (1%, 2 óra) fixáltuk Ezt követően Durcupán ACM epoxy resin (Fluka Chemie AG). műgyantába ágyaztuk a mintákat.

A metszést Reichert-Jung ULTRACUT E ultramikrotómmal végeztük. Az 50-70 nm vastagságú (ultravékony) metszeteket uranilacetát (5%, 4 percig) és ólomcitrát (5%, 5 percig) oldatokkal kontrasztosítottuk. A vizsgálatokat HITACHI H-7100-as elektronmikroszkóppal végeztük.

4.13. A szimbiózis partnerek által kibocsátott aminosavak meghatározása

A kibocsátott aminosavak összetételét aminosav analízátorral határoztuk meg. A méréshez a törzsek 4 napos szuszpenzióit valamint a szimbiózis kultúrák 2 hetes folyékony tenyészeit használtuk. A kapott keveréket papírszűrőn, majd 0.45 µm-es membránszűrőn való átszűrés után analizáltuk.

A mérés ioncserés kromatográfiával történt. A 220x3.7 mm hosszúságú oszlop IONEX OSTION LCP5020 kationcserélő gyantát tartalmazott. A detektálás két különböző, 440 nm és 570 nm hullámhosszon történt.

4.14 DNS izolálás, amplifikálás és szekvenálás

Az *Azotobacter vinelandii*, *Chlamydomonas reinhardtii* és *Alternaria sp.* törzsek genomi DNS-ét a törzsek illetve a hármasszimbiózis tenyészeiből FastPrep rendszer (Qbiogene Inc., MP Biomedicals) segítségével izoláltuk. A sejtek feltárása FastPrep készülék segítségével történt. A növényi DNS kivonására a FastDNA Kit (Qbiogene Inc.) CLS-VF feltárási oldatot használtuk.

Az *A. vinelandii* nitrogénáz 3 (*anfH*) génjének detektálására a következő primereket használtuk: ANF3FOR (5'-GGCCTATTCCACGACAAGA-3') and ANF3REV (5'-ATCATCTTGGTACCGATGGC-3') (Joerger és mti., 1989).

A *C. reinhardtii* kimutatását a *p60* katanin alegységre specifikus primerekkel végeztük (Katan-F 5'-ACGAGGAGTGGCTCAGCGTGTTTCG-3'; Katan-R 5'-GGACGCCAAGCTTCAAATCCACG-3') (Kathir és mti., 2003).

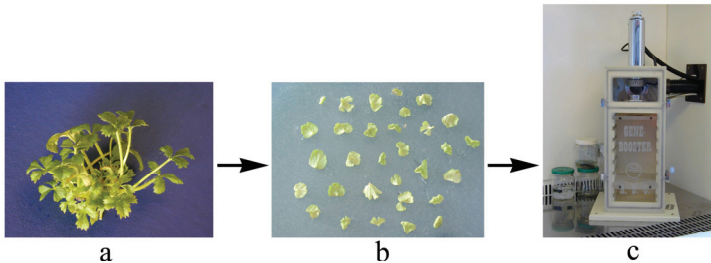
A gomba nrDNA ITS régióját ITS1F és ITS4 primerekkel (Jakucs és mti., 2005) amplifikáltuk és szekvenáltuk. A szekvenciát a GenBank-ban elhelyeztük (FJ627005). Az elhelyezett szekvenciák nyilvános adatbázissal való összevetését az NCBI nukleotid BLAST (Altschul és mti., 1990) homológia kereső programja (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) segítségével végeztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1 *Fragaria x ananassa* – *Azotobacter vinelandii* asszociáció létrehozása és vizsgálata

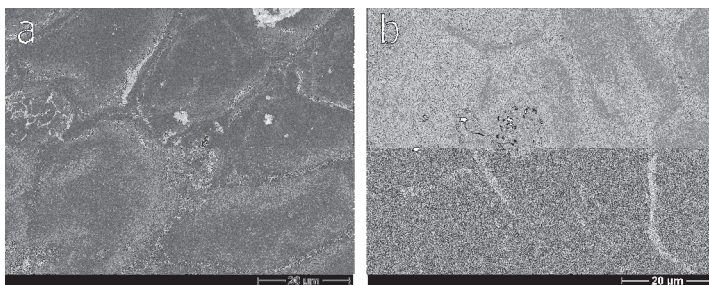
5.1.1 Baktériumsejtek belövése a növényi szövetekbe

A baktériumok biztosabb bejuttatására a növényi szövetekbe egy, a Növénysszervezettani Tanszéken már korábban kidolgozott eljárást alkalmaztunk (Preininger és mti, 2001; 2003). A növények genetikai transzformálására általánosan használt génpuskát alkalmaztuk a bejuttatáshoz (7.c ábra). A módszer hasonló a génbelövéshez, azaz wolfram szemcséket használtunk fel mikrohordozóul, melyekre nem DNS-t, hanem a baktérium sejteket „ragasztottuk”. Olyan szemcseméretet választottunk, amely elegendően nagy ahhoz, hogy a baktériumok rátapadjanak. A 2-3 µm szemcseátmérőjű részecskék elegendőnek bizonyultak a kísérletbe vont kb 1-3 µm méretű *A. vinelandii* belövéséhez. Célszövetnek a mikroszaporított növények fiatal leveleit választottuk (7.a,b ábra). A belövés után vizsgáltuk a sérülésekkel teli levelek felszínét.



7. ábra A baktériumok bejuttatása a növényi szövetekbe. a. A belövéshez használt steril szármóca hajtástenyészet. b. Hajtástenyészetből származó fiatal levelek regenerációs tápközegre helyezve egy nappal a belövés előtt. c. A baktériumok bevitelére szolgáló génpuska. A 2-3 mm átmérőjű wolfram szemcsékhez kötött baktériumokat 30 bar-al löttük be. A baktériumok bevitelére szolgáló génpuska. A 2-3 mm átmérőjű wolfram szemcsékhez kötött baktériumokat 30 barral löttük be.

A scanning elektronmikroszkópos felvételek tisztán mutatják a lövések becsapódási helyét. A mikrolövedékek által okozott kis méretű sérülések néhány vagy akár egyetlen sejtet is érinthetnek (8.a ábra). A génpuska alkalmazásánál általános jelenség, hogy a wolframszemcsék egy része a szétrázás és a lövedékek útjába helyezett finom fémrács ellenére aggregálódik, és úgy csapódik be a növényi szövetekbe. Ezek az aggregátumok több sejt átmérőjű, mélyebb sérüléseket, „krátereket” okozhatnak (8.b ábra).

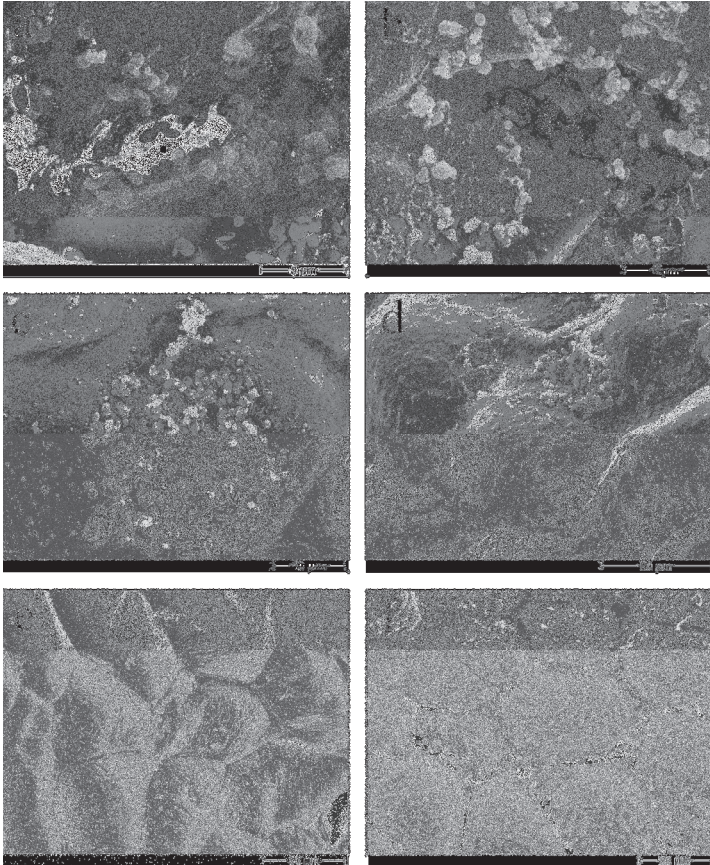


8. ábra A mikrolövedékek által kialakult, több sejtet érintő kráter (a) és az egyetlen sejtet érintő sérülés (b) a levél felszínén

5.1.2. A belövés okozta sérülések nyomon követése scanning elektronmikroszkóppal

A bioliztikus kezelés során a becsapódó lövedékek különböző méretű és mélységű sérüléseket okozhatnak a célszövet felszínén. Belövés után folyamatos mintavétellel közel egy hónapig követtük nyomon scanning elektronmikroszkóppal a sérülések állapotát. Figyeltük, hogy mennyi ideig látható a becsapódás helye, mikor regenerálódnak a lövés okozta sérülések, remélhetően a levél belső szöveibe zárva a baktériumokat. Megállapítható, hogy a kezelés után néhány óráig jól láthatók a mikrolövedékek által okozott sérülések és a kráterekben a belőtt baktériumok (9.a-b ábra). Még 24 óra után is látszik a sérülés, de ekkor már kevésbé mély, vélhetően a mélyebb régiókból kifelé elindult a szöveti regeneráció (9.c ábra). 2-29 napig vizsgálva a leveleket a belövés után, két nap után már szövetregeneráció figyelhető meg, és így a sérülések már nem látszanak (9.d ábra). A lövés helye azonban

továbbra is látható, egyrészt a lövés következtében elpusztult felszíni sejtek utalnak rá, másrészt a felszínen folyamatosan szaporodnak a kívül maradt baktériumok (9.e-f ábra).



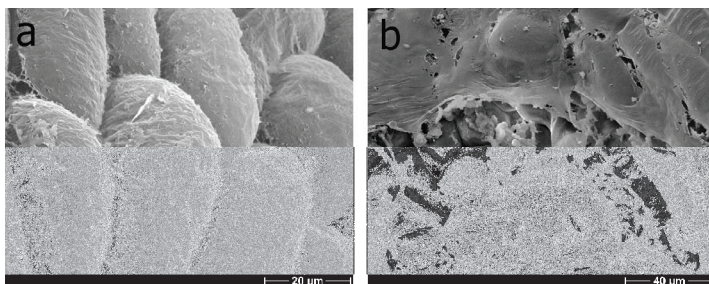
9. ábra A belövés okozta sérülések nyomon követése scanning elektronmikroszkóppal. A kezelés után eltelt idő fél óra (a), 2 óra (b), 24 óra (c), 2 nap (d), 12 nap (e) és 26 nap (f). Fél órával a kezelés után jól láthatóak a sérülések és a belőtt baktériumok. A két órás mintán még látszanak a mikrolövedékek által okozott mélyebb „kráterek”, azonban a belövés után 24 órával megindul a szövetek regenerációja. Két nap után már megfigyelhető a szövetek regenerációja. Két hét elteltével jelentősebb változásokat már nem tapasztaltunk. A becsapódás helyeit az elpusztult sejtek és a felszínen levő baktériumok jelzik.

5.1.3. A növényregeneráció vizsgálata

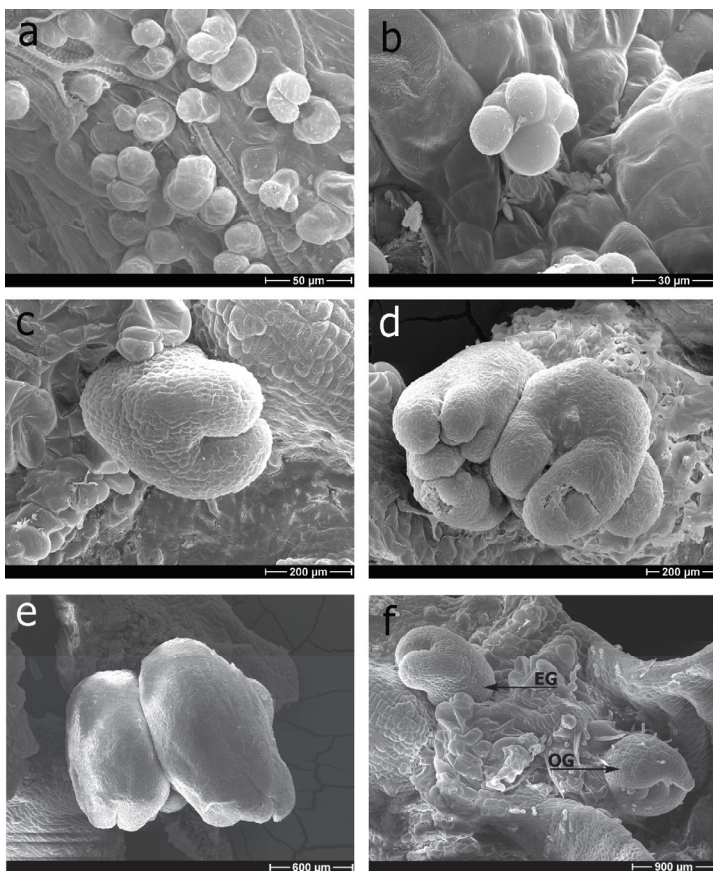
A növényregeneráció vizsgálata során lépésről lépésre nyomon követtük a folyamatot scanning elektronmikroszkóp segítségével. A táptalajra helyezett leveleken a regeneráció általában a vágási felületeken indult meg. A felvételek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a szamóca esetében a regeneráció szomatikus embriogenezissel és organogenezissel egyaránt végbemehet.

A szomatikus embriogenezis első lépéseként az epidermisz sejtek megduzzadtak, majd a kutikula felszakadt (10. ábra). Később a levelek mezofillumából differenciálódó sejtes majd osztódó embriogén sejtek áttörték az epidermiszt (11.a ábra). A felvételeken nyomon követhettük az embriogenezis egyes stádiumait a néhány sejtes proembriótól a szív stádiumon keresztül egészen az érett embriók kialakulásáig (11. b-e ábra).

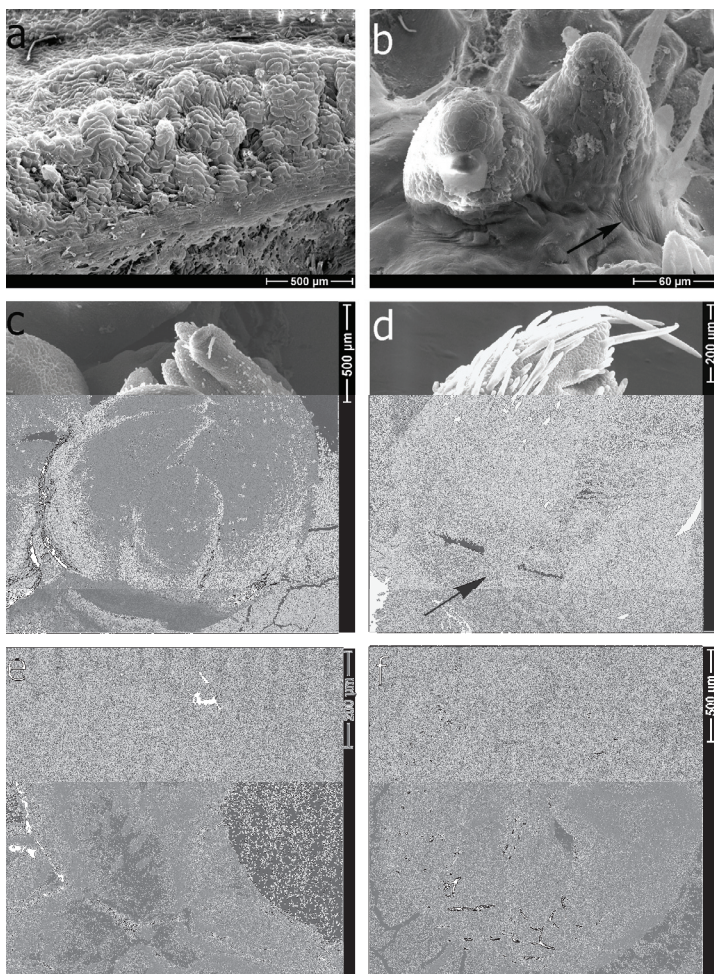
Az organogenezis kezdeti lépéseiben kiemelkedéseket figyeltünk meg a szövetek felszínén (12.a ábra). A folyamat során az epidermiszsejtek is osztódtak, és a kutikulával együtt folytonosan borították a képződő primordiumokat. Erre utalnak a primordiumok tövében látható kutikula gyűrődések (12.b ábra). A szamócára jellemző szörképletek már a fiatal hajtáskezdeményeken megjelentek (12.d-e ábra). A 12.d ábrán, ahol a fejlettebb hajtáscsúcs mellett újabb, fiatalabbak is megjelennek, ahogy azt a (→) mutatja, jól látható egy egészen új, mindössze 3 levélprimordiummal rendelkező kis hajtáscsúcs organizációja is. A 12.e-f ábrák pedig arról tanúskodnak, hogy a fejlődő fiatal hajtások már a levélen multiplikálódnak.



10. ábra A szomatikus embriogenezis első lépései. a. Az epidermisz sejtek megduzzadnak, majd b. A kutikula felszakad.



11. ábra A szomatikus embriogenezis fázisai szamóca levélen. a. A levelek mezofillumából differenciálódó egysejtes majd osztódó embriogén sejtek b. Az embriogén sejtből kialakult nyolcsejtes proembrió c. Az epidermiszt áttörő szív stádiumú embrió d. Korai torpedó stádiumú embriók csoportja e. Érett embriók f. A regeneráció két formája ugyanazon a levélen (EG = embriogenezis, OG = organogenezis)

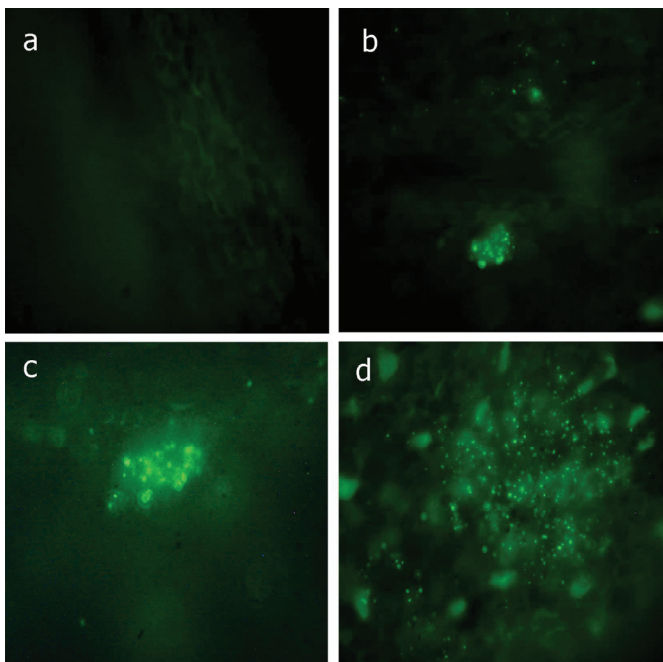


12.ábra Az organogenezis lépései. a. Kiemelkedések két ér között a levél fonáki oldalán b. Fejlődő hajtáscsúcsok, az eredeti levélepidermisz és kutikula folytonosan borítja a képződő primordiumokat c. Fiatal hajtáskezdemény levelekkel – még a megnyúlás előtt. A szörkpéletek még az alapi részen koncentrálnak. d. Az organogenezis különböző fázisai láthatóak ugyanazon a levélen – az egész fiatal, apró, 3 levélprimordios hajtáscsúctól (→) a fejlettebb, már szörkpéletekkel borított hajtásig e. Multiplikálódó fiatal hajtások f. Fiatal hajtások csoportja — csúcsra boruló levelekkel

5.1.4. A *green fluorescent protein* gént tartalmazó baktériumok kimutatása a belőtt célszövetekben

5.1.4.1. A baktériumok kimutatása fluoreszcens mikroszkóppal

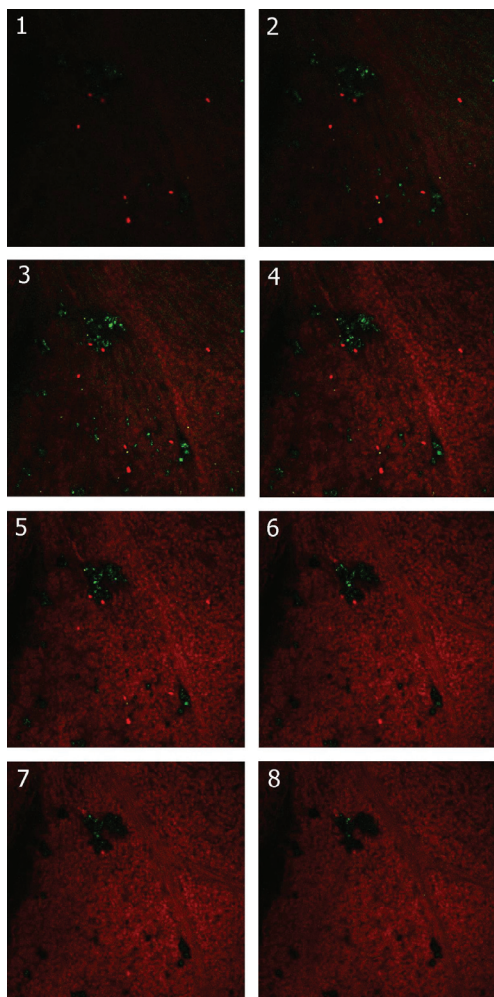
A beépített *green fluorescent protein* gén segítségével a baktériumokat a belövés után *in situ* vizsgálhattuk. Az epifluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek a 13. ábrán egyértelműen igazolják a kontroll levélhez képest (13.a ábra) a belövés következtében keletkező kráterekbe becsapódott baktériumok jelenlétét (pl. b, c ábrák), míg a 13.d ábra az egyedi baktériumokat mutatja.



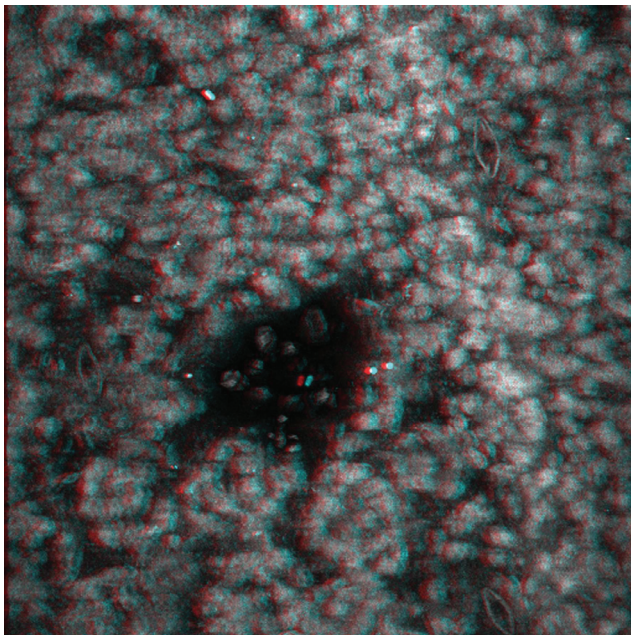
13. ábra A *gfp* gént tartalmazó *Azotobacterekkel* belőtt szamóca levelek vizsgálata epifluoreszcens mikroszkóppal. a. Kontroll b.-d. baktériumokkal belőtt levelek. A kráterek jól látszanak a 'b' és 'c' képeken, a 'd' kép inkább az egyedi sejteket mutatja. Nagyítás: a-b: 400x; c-d: 200x

A laser scanning mikroszkópos vizsgálatokhoz fiatal leveleket lőttünk be. A 14. ábrásor a 2 μm résszélességgel készített optikai szeleteket mutatja a levélfelszíntől (14.1. ábra) a mélyebb rétegekig (14. 2-8 ábra). Látható, hogy a felszínhez képest kissé mélyebben, a 4. rétegtől kezdve jól körvonalazódnak a belövés okozta kráterek, és bennük a fluoreszkáló baktériumok. Még az utolsó rétegben (14.8 ábra) is megfigyelhetők baktériumok, még ha kisebb számban is.

A rétegfelvételek segítségével térbeli rekonstrukciót is készítettünk egy másik belőtt levél vizsgálata során, és létrehoztunk egy 3 dimenziós képet (15. ábra), melyet vörös-zöld szemüveggel nézve valóban térbelinek érzékelhetünk. A kép közepén lévő kráterben és a környező szövetekben láthatók a belőtt, fluoreszkáló baktériumok. A kráter felső régiójában megfigyelhető izodiametrikus elemek a mikrohordozóul használt wolfram szemcsék. Az epidermisz felszínét a felvételen látható három sztóma zárósejtpár jelzi.



14. ábra Laser scanning mikroszkóppal készített optikai szeletek a felszíntől (1) a mélyebb rétegekig (2-8). A 4. rétegben jól körvonalazódnak a belövés által okozott kráterek, baktériumok még a legmélyebb rétegben is látszanak (8). Nagyítás: 400x



15. ábra A belőtt szamóca levelek 3 dimenziós képe. A kráter közepén jól láthatók a belőtt baktériumok és az izodiametrikus wolfram szemcsékvalamint sztómák a felszínen. Nagyítás: 1000x

5.2. Alga –baktérium-gomba asszociáció vizsgálata

A magasabbrendű növényekkel létrehozott asszociációk vizsgálata során számos probléma merül fel. A baktériumokat a szövetekben hordozó növények *in vitro* tenyészteti nem tarthatók fenn teljesen nitrogénmentes tápközegen, ezért nehezen kimutatható, mennyi nitrogénforrást szolgáltat a növény számára baktériumpartnerre. A két szervezet által egymás anyagcseréjére gyakorolt hatás vizsgálata szintén nehézségekbe ütközik. A kibocsátott anyagcseretermékek ugyanis a növényi sejtek közötti apoplasztikus térben találhatók, melynek vizsgálatára nem találtunk jó módszert.

Ezért döntöttünk úgy, hogy a Tanszéken már korábban létrehozott egysejtű modell rendszerrel kezdtünk újra dolgozni. Ez a modell asszociáció nitrogén- és szénforrásmentes körülmények között fenntartott egysejtű zöldalga *Chlamydomonas reinhardtii* és diazotróf *Azotobacter vinelandii* együttélése. Egysejtű szervezatként a *Chlamydomonas* kiválóan alkalmas a szimbiózis modellezésére, jól vizsgálható, gyorsan reagál a környezeti változásokra. A modell szimbiózis legfontosabb markere az a tény, hogy az alga vegetatív sejtjei nitrogénhiányos feltételek mellett gamétákká alakulnak. A hosszantartó nitrogénéheztetés során a sejtek 80S és 70S riboszómái szétesnek, egyetlen plasztiszuk degradálódik, ennek következtében az algasejtek sárga színűvé válnak, osztódni már nem képesek. A sárga színű, degradálódott sejtek nitrogén tartalmú közegen ismét kizöldülnek. Ez a jól látható változás az alapja annak, hogy a különböző feltételek között tartott alga-baktérium szimbiózisokban bekövetkező változások fenotípusosan is jól követhetők.

A tenyészetek fenntartása, új közegre passzálása során egy véletlen fertőzés következtében gombafonalak jelentek meg az egyik tenyészetben. Megfigyeltük, hogy fenotípusát tekintve ez az asszociáció szebbnek, zöldebbnek mutatkozott a kétpartneres kapcsolatnál. A kapcsolat nem volt invazív, a gombafonalak nem nőttek túl az alga-baktérium telepét. A három szervezet hosszú ideje, három éve kiegyenlítettten él együtt szén- és nitrogénmentes táptalajon, kapcsolatuk a sorozatos, kéthavonkénti passzálások után is stabil maradt.

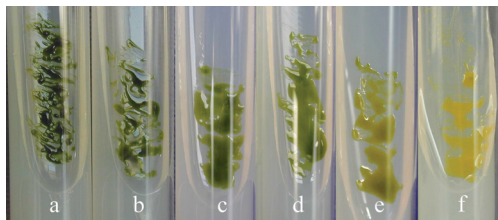
Kíváncsiak voltunk egyrészt arra, hogy milyen gomba taxon lett a szimbiózis harmadik partnere, másrészt, hogy hogyan befolyásolja a gomba jelenléte az algák nitrogénellátottságát, hiszen a fenotípus alapján azt vártuk, hogy a hármas szimbiózisban az algák nitrogénellátottsága jobb, mint a kettesben.

Ahhoz azonban, hogy képet kapjunk arról, milyen értékeket mutat, hogyan viselkedik a *Chlamydomonas* nitrogénhiány esetén, elvégeztünk néhány előkísérletet. Ezek során a zöld algatenyészeteket nitrogénmentes tápközegre helyeztük, és három hétig folyamatos mintavétellel vizsgáltuk a fotoszintetikus paramétereit és ultrastrukturális állapotát. A kisárgult algatenyészeteket később nitrogéntartalmú közegen regeneráltattuk, mérésekkel kísérve ezt a folyamatot is. Ezeket az eredményeket tárgyalja a következő fejezet.

5.2.1. A *Chlamydomonas reinhardtii* fotoszintetikus apparátusának szerveződése és működése nitrogén elvonás és visszapótlás hatására

5.2.1.1. Algasejtek degradációja nitrogénmentes táptalajon („sárgulás” folyamata)

Nitrogénmentes táptalajon, ferde agaron nevelt alga tenyészetek kezdeti sötétzöld színe fokozatosan kisárgult. Már a harmadik napon szemmel láthatóan érzékelhető a változás, a nyolcadik naptól kifejezetten sárgás árnyalatúak lettek a tenyészetek. Harminc nap után ez a sárga szín is annyira halványná vált, hogy alig különült el az agaros tápközeg alapszínétől (16. ábra).

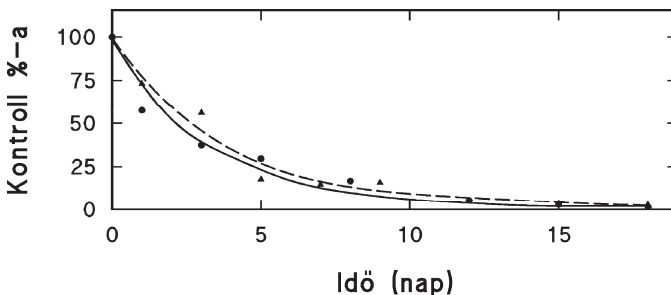


16. ábra Algasejtek degradációja nitrogénmentes táptalajon. A kontroll tenyészethez (a) képest nitrogénmentes közegen az algasejtek fokozatos kisárgulását tapasztaltuk (b= 1 nap; c= 3 nap; d= 4 nap; e= 8 nap; f= 21 nap)

5.2.1.1.1. Az algák klorofilltartalmának és fotoszintetikus oxigéntermelésének meghatározása

A nitrogénhiány hatására bekövetkező, szemmel is jól követhető sárgulás folyamata alapvetően a klorofilltartalom csökkenésének következménye. Az összklorofill mennyisége már első nap jelentős mértékben, a kiindulási érték 60%-a alá csökkent. A csökkenés üteme különösen kezdetben volt nagy mértékű, az 5. napon az eredeti klorofilltartalom 30%-a, 8. nap már csak a 17%-a fordult elő a mintákban, a 18. napha a kontroll értéknek mindössze 1,5 %-a volt mérhető. A sárgulás folyamán a klorofill-b mennyisége nagyobb mértékben csökkent, mint a klorofill-a, így a klorofill a/b arány nőtt, a kezdeti 2,1 értékről 4,1-re a sárgulási időszak végére.

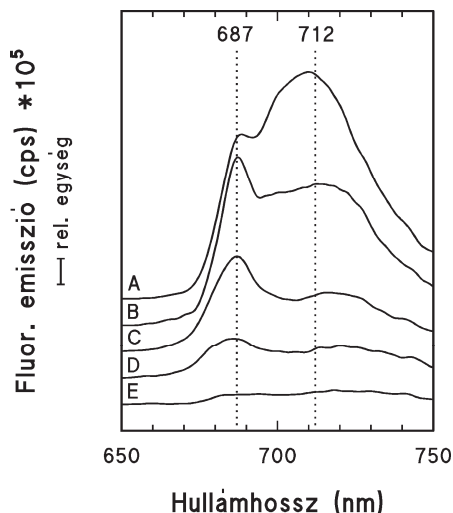
A nitrogénhiányos körülmények között fenntartott algasejtek klorofilltartalmának fokozatos csökkenése maga után vonta a fotoszintetikus aktivitás intenzitásának csökkenését is, melyet a nettó oxigéntermeléssel jellemeztünk. A kétféle folyamat üteme nagyon hasonló. A kezdeti jelentős klorofilltartalom csökkenés hatására az oxigéntermelés is az első 5 nap csökkent a legnagyobb ütemben. A harmadik napon az eredeti nettó fotoszintézisnek már csak a felét kaptuk, 5. napha pedig lecsökkent 18% alá. Ezután a csökkenés mértéke lelassult. A 15. napon mért igen alacsony oxigéntermelés kiindulási értékhez viszonyított aránya (2,9%) pontosan megegyezett a 15. napon mért klorofilltartalom hasonlóan számolt arányával (2,9%). Ez az alacsony érték már nem változott a 21 napos mintákban (17. ábra).



17. ábra Az algák klorofill tartalmának és fotoszintetikus oxigéntermelésének változása a „sárgulás” folyamata során. (• - klorofill tartalom; ▲ - fotoszintetikus oxigéntermelés)

5.2.1.1.2. A klorofill-protein komplexek vizsgálata kisárguló algatenyészetekben

Nitrogénmentes tápközege helyezett *Chlamydomonas* sejtek 77K fluoreszcencia emissziós spektrumait vettük fel 0, 2, 8, 15 és 37 nap után (18. ábra). A kontroll (0. nap) mintáról mért 77K fluoreszcencia emissziós spektrumban 688,5 és 710 nm-en található maximumok, intenzitás-arányuk 0,73. Nitrogénmentes közegen tartva a tenyészeteket, a rövid és hosszú hullámhosszú sáv aránya a 8. napig nőtt, utána csökkent. A kontroll spektrumban 710 nm-es sáv hosszabb hullámhossz irányába tolódott már egy nap alatt, a 688,5 nm-es sáv pedig a rövidebb hullámhossz felé. A 37. nap után mért spektrumban nem láthatóak elkülönülő maximumok, az algasejtek „kisárgultak”.



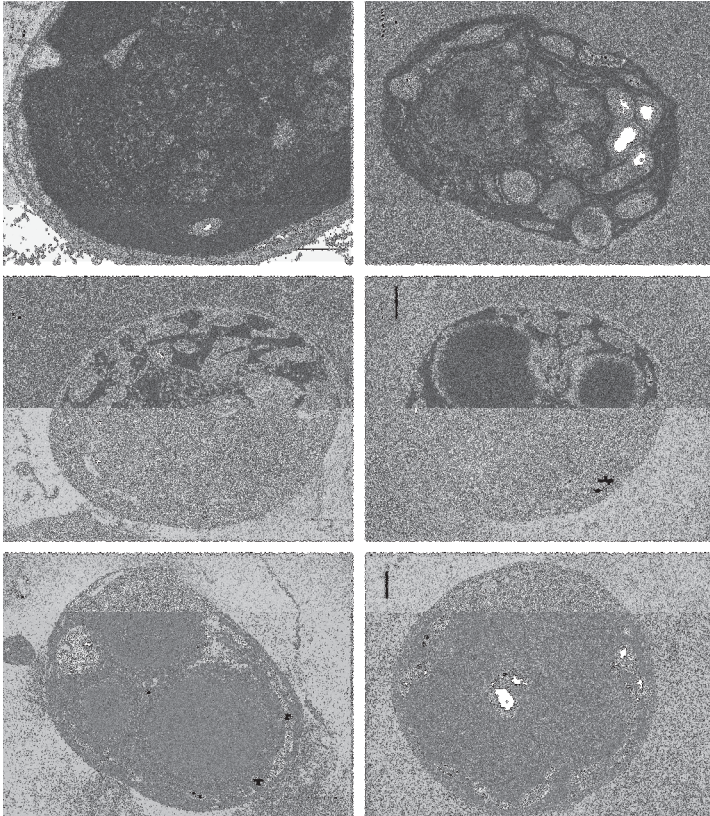
18. ábra A kisárgulás 0 (A), 2 (B), 8 (C), 15 (D) és 37 (E) napos mintáinak 77 K fluoreszcencia emissziós spektrumai. Gerjesztési hullámhossz 440 nm. A számok az emissziós maximumokat jelölik (nm-ben).

5.2.1.1.3. Az algasejtek ultrastrukturális változásai

Nitrogénmentes tápközegen kisárguló alga tenyészetek sejtjeiben a tilakoidmembránok fokozatos degradációja figyelhető meg. A biokémiai és biofizikai változásokhoz képest azonban az ultrastrukturális változások valamivel lassabban zajlottak le.

A kontroll sejtekben (19.a ábra, 0. napos minta) jól láthatóak a gránumokba szerveződött tilakoidmembránok. A nitrogénhiány hatására bekövetkező fokozatos degradáció leglátványosabban ezt a membránrendszert érintette. A membránfehérjék után a membránlipidek is lebomlottak, a sejtekben lipidcseppek jelentek meg. A sárgulási folyamat során a sejtekben fokozatosan növekedett a lipidcseppek és a keményítőszemcsék száma. Ez a tendencia már a 2. napon is valamennyire megfigyelhető volt (19.b ábra), az 5. napra már kifejezetté vált (19.c ábra). A nitrogén éheztetés hatására részlegesen emésztett sejt tartalommal rendelkező autofág vakuolumok jelentek meg a sejtekben (19.d ábra). Itt a gránumszerű struktúrák nagyrészt már lebomlottak.

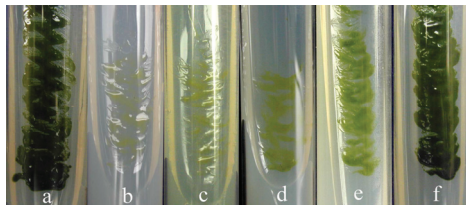
A 13 napos mintában már egyáltalán nem találtunk gránumszerű membránszerkezetet (19.e ábra). A tilakoidok csak egyesével, esetleg kettesével látszottak a plasztisz szélén. Három hét eltelte után gyakorlatilag a sejt legnagyobb részét az óriásivá összeállt lipidcseppek töltötték ki, ez jól megfigyelhető a 21 napos mintáról készített elektronmikroszkópos képen (19.f ábra).



19. ábra Nitrogénmentes közegen tartott algasejtek kloroplasztiszainak lebomlása. A 0 napos (a) mintán jól láthatók az ép tilakoidmembránok. A 2 napos mintán (b) kezdeti membrándegradáció látszott és lipidcseppek, valamint keményítőszemcsék jelentek meg. Az 5 napos (c) minták további lipidfelhalmozódást mutattak. A 8 nap (d) után már alig voltak láthatók tilakoidmembránok, a 13 (e) és 21 napos (f) minta sejtjeit nagyrészt lipidcseppek töltötték ki. (bar = 1 μ m)

5.2.1.2. A nitrogénmentes táptalajon kisárgult alga tenyészetek vizsgálata nitrogéntartalmú közegre való visszaoltás után („visszazöldülés” folyamata)

A nitrogénmentes közegen előzőleg kisárgult algatenyészeteket újra nitrogéntartalmú táptalajra helyezve, megfigyeltük a visszazöldülés folyamatát. A sejtek fokozatosan visszanyerték eredeti sötétzöld színüket. A kisárgulással szemben a visszazöldüléshez mindössze néhány napra volt szükségük az algasejteknek (20. ábra).



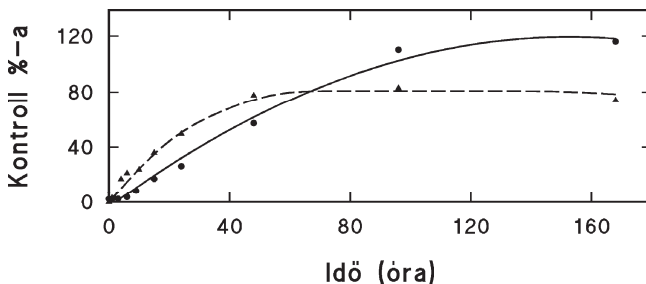
20. ábra Nitrogénmentes közegről nitrogén tartalmú közegre visszahelyezett algasejtek regenerációja. (a= kontroll; b= 3 óra; c= 6 óra; d= 1 nap; e= 2 nap; f= 5 nap)

5.2.1.2.1. Az algák klorofilltartalmának és fotoszintetikus oxigéntermelésének meghatározása

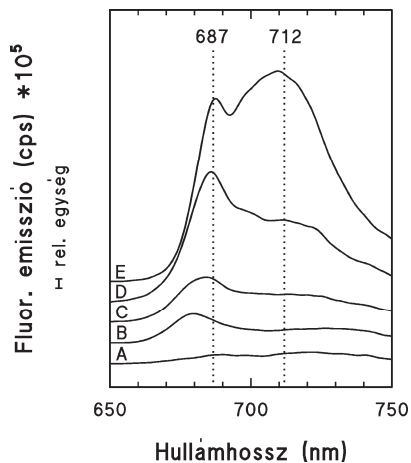
A visszazöldítés folyamatában az összklorofill tartalom tulajdonképpen már a kezdeti órákban növekedni kezdett, igaz, csak kis mértékben, 1,7%-ról 6 óra után 3,3%-ra, majd a 15. órában 15%-ra emelkedett. 1 nap után a klorofilltartalom elérte a normális zöld sejtekre jellemző érték negyedét, 2 nap után a felét. A visszazöldítés 5. napjára a klorofill tartalom meghaladta a kontroll zöldalgánál tapasztalt értéket. A kezdeti, kisárgult sejtekben a klorofill a/b arány magas volt (4.1). A zöldülés során ez az arány fokozatosan csökkent, és végül a kisárgult sejteknél számolt érték fele lett (2.0).

A klorofilltartalom növekedése maga után vonta a fotoszintézis intenzitásának növekedését is. Az oxigéntermelés az első két órában csak minimális volt (3-4% a kontroll zöld algasejtekhez viszonyítva), majd a 2. és a 4. óra között erősen megugrott, 4 óra után pedig elérte a normális érték ötödét. A fotoszintetikus aktivitás a 20. órában már majdnem

50%-os volt. A 2. nap után 80%-os értéket ért, az elkövetkező két napban pedig már csak minimális növekedés volt tapasztalható (21. ábra).



21. ábra Az algák klorofill tartalmának és fotoszintetikus oxigéntermelésének változása a visszazöldülés folyamata során. (● - klorofill tartalom; ▲ - fotoszintetikus oxigéntermelés)



22. ábra Nitrogénmentesről nitrogént tartalmazó közegre helyezett alga tenyészetekről 0 (A), 6 (B), 24 (C), 48 (D) és 120 (E) órák után mért 77 K fluoreszcencia emissziós spektrumok

5.2.1.2.2. A klorofill-protein komplexek vizsgálata a kisárgult algatenyészetek nitrogén tartalmú közegre való átoltása után

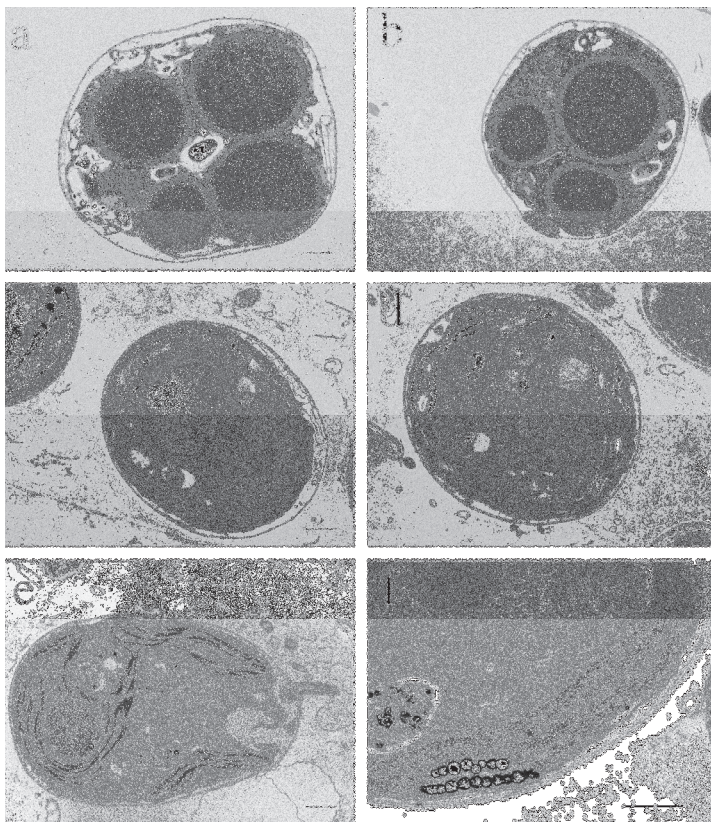
Nitrogénmentes közegről nitrogén tartalmú közegre téve a tenyészeteket már 6 óra után mérhető volt egy 679,5 nm-es sáv a 77K fluoreszcencia emissziós spektrumban (22. ábra), amely fokozatosan hosszabb hullámhosszok felé tolódott. A 6 óránál rövidebb ideig újra nitrogénes közegre tett („visszazöldített”) tenyészetek spektrumaiban a sávok pozíciója nem pontos, mert nincsenek jól elkülöníthető maximumok. A zöldüléssel párhuzamosan összességében a hosszabb hullámhosszú maximummal jellemezhető sáv balra, míg a rövidebb hullámhosszú maximum jobbra tolódott a spektrumokban. 120 óra után a kontroll zöld mintához hasonló spektrumot kaptunk 687,5 és 710 nm-es maximumokkal (22. ábra).

5.2.1.2.3. Nitrogéntartalmú közegre helyezett tenyészetek ultrastruktúrájának vizsgálata

A nitrogénmentes tápközegen teljesen kisárgult alga tenyészeteket újra nitrogént tartalmazó TAP közegre helyeztük, melynek hatására a sejtekben fokozatosan újraépült a sejtek tilakoid membránrendszere. Az alga sejtek visszazöldülési folyamata sokkal gyorsabban - néhány nap alatt - végbement, mint a kisárgulásuk, és szabad szemmel is jól követhető volt a színváltozás (23.b-f ábra). Emellett a sejtekben zajló ultrastrukturális változásokat is nyomon követtük óránkénti mintavétellel.

A kiinduló állapot 21 napig nitrogénmentes TAP tápközegen tartott algatenyészet volt, melyben teljesen lebomlott a tilakoid membránrendszer (23.a ábra), és a telep színe szabad szemmel nézve is, halványsárga színű volt. (20.b ábra). A tilakoid rendszer visszaépülésének kezdete már az első órákban megfigyelhető volt, és a 14. órában már kettesével összetapadt, határozott lefutású tilakoidmembránokat láttunk. A lipidcseppek mennyiségének csökkenése 1 nap után (23.c ábra) volt jelentős, 2 nap után mennyiségük már a normális zöld algasejt szintjére esett vissza (23.d ábra).

A 24 órás mintában (23.c ábra) már szabályosan felépült membránrendszer látható, összetapadt tilakoidokkal, ennek mennyisége és az összetapadás mértéke még tovább növekedett a 2, 3,5 és 5 napos mintákban. Már a 2 napos visszazöldült algasejt is teljesen „működőképesnek” látszott ultrastrukturálisan (23.d ábra) és a 3.5 napos sejt szinte nem is különbözött az 5 napostól, nagyon szépen látszott mindkettőben a gránumszerű struktúra.



23. ábra Nitrogénmentes közegről nitrogént tartalmazó közegre helyezett alga sejtek elektronmikroszkópos képei. A kisárgult (0 órás) (a) alga sejtekben felhalmozódott nagyméretű lipidcseppek között alig látszottak a sejt egyéb struktúrái. A 14 órás (b) mintán már látható volt a membránok gyors visszaépülése. A 24 órás (c), 2 napos (d), 3.5 napos (e) és 5 napos (f) mintákról készült felvételeken látható a kloroplasztisz membránrendszerének fokozatos visszaépülése. (bar = 1 μ m)

5.2.2. Alga – baktérium – gomba asszociáció vizsgálata

5.2.2.1. Mikroszkópos vizsgálatok

Az asszociáció szerkezetének, felépítésének megismeréséhez fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk.

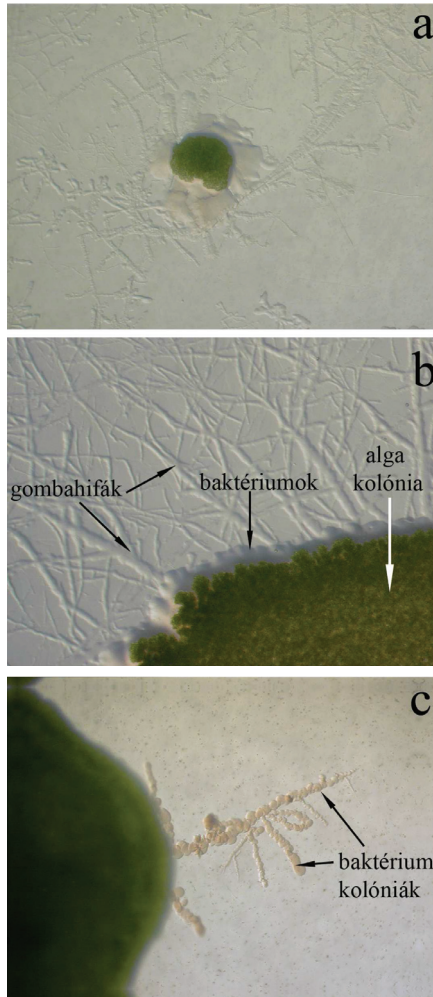
A fénymikroszkópos felvételeken figyelemmel kísérhetjük egy telep növekedését az új tápközegre helyezést követően. A 24.a ábra egy újonnan formálódó, fiatal telepet mutat. Már ebben a korai stádiumban is megfigyelhető a partnerek jellegzetes elhelyezkedése a telepen belül, a középén csoportosuló zöld algakolóniát baktériumok és gombahifák veszik körül.

A telep fejlődése folyamán a partnerek növekedési üteme eltérő. A baktériumok intenzívebben osztódnak, mint az alga sejtek, ezért nagy tömegben találjuk meg őket a telep szélén (24.b ábra). A gombahifák radiálisan ágaznak ki a telepből, a tápközeg felszínén és belsejében egyaránt növekedve. Érdekes, hogy egyes hifák felszínéhez telepszerűen hozzátapadnak az *Azotobacterek*, kisméretű, gyöngysorszerű kolóniákat hozva létre rajtuk (24.c ábra).

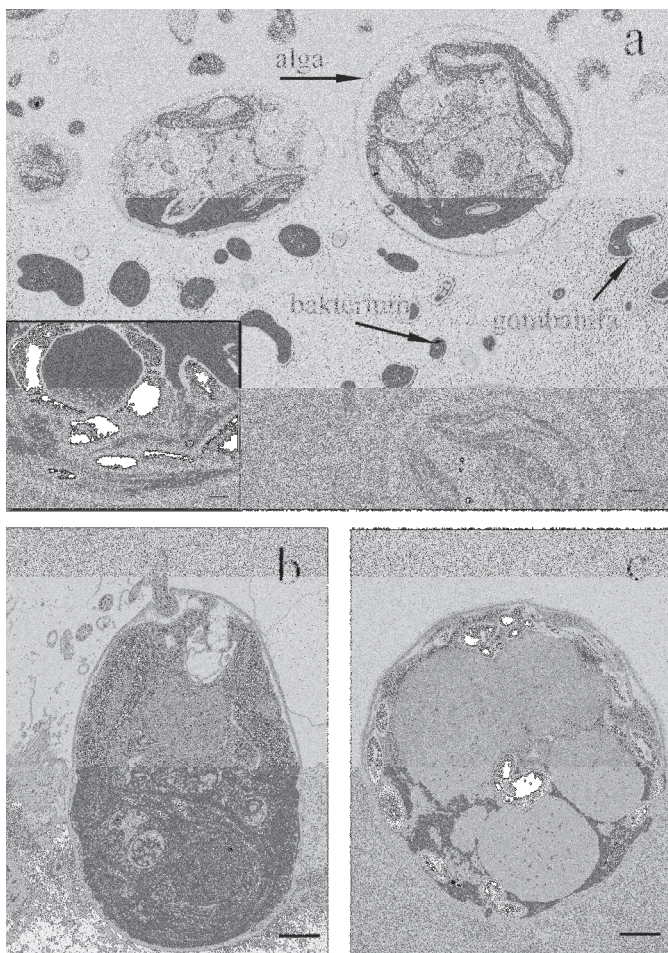
A telep algasejtjei zöld színűek. Ez a tény, valamint a telep folyamatos növekedése arra utal, hogy elegendő mennyiségű nitrogénforrás érhető el számukra a fennmaradáshoz és szaporodáshoz. A telep jellegzetes szerkezete a friss közegre passzálást követően 2-3 hét elmúltával alakul ki, és a későbbiek folyamán mindvégig stabil marad.

Mivel a telep középső, zöld részén fénymikroszkóppal csak az algasejtek láthatók, mintát vettünk erről a területről és elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, hogy megismerjük a telep belső szerkezetét. A felvételek tanúsága szerint a telep középső részében is megtalálhatók a gombahifák és a baktériumok az algasejtek között (24.a ábra).

A *Chlamydomonas reinhardtii* sejtjei a képek alapján egészségesnek tűnnek, egyetlen, nagy kloroplasztiszuk jól fejlett tilakoid membránrendszerrel rendelkezik (25.a ábra, inset), akárcsak a komplett tápközegen fenntartott kontrol alga törzs (25.b ábra). A nitrogénhiány jeleit, keményítőszemcsék felhalmozódását illetve lipidcseppek jelenlétét nem tapasztaltuk.



24. ábra A hármas asszociációról készült fénymikroszkópos felvételek. a: fiatal, újonnan formálódó telep. A középső, sötétzöld részen csoportosulnak az algasejtek, melyeket baktériumok és gombahifák vesznek körül. b: a kolónia szélén megfigyelhetők a telepből radiálisan kiágazó gombafonalak. c: hifák felszínéhez tapadt, gyöngyszerű telepet alkotó baktérium kolóniák.



25. ábra Különböző tápközegeken tartott *Chlamydomonas reinhardtii* sejtek illetve a hármas asszociáció elektronmikroszkópos felvételei. a: nitrogén- és szénforrás mentes közegen fenntartott hármas asszociáció. A mintavétel a telep középső, zöld régiójából történt. b: optimális közegen fenntartott, kontroll zöldalga sejt. c: nitrogénmentes tápközegen 21 napig tenyésztett, kisárgult algasejt (negatív kontroll) (bar= 1 μ m, beszűrt kép nagyítása= 0,25 μ m)

5.2.2.2. Klorofilltartalom és fotoszintetikus oxigéntermelés

A szimbiózis algáinak megfelelő nitrogénellátottsága leginkább fotoszintetikus apparátusuk állapotával jellemezhető. Ennek vizsgálatához megmértük klorofilltartalmukat és fotoszintetikus oxigéntermelésüket. Az eredményeket algasejtre viszonyítva adtuk meg (3. táblázat).

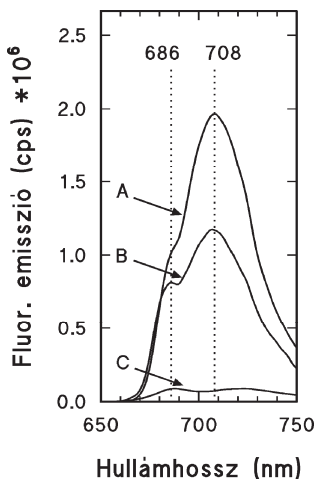
A hármas szimbiózisban az algasejtek relatív magas aránya ellenére a mért klorofilltartalom viszonylag alacsony, a kontroll, optimális tápközegen fenntartott algatenyésztéhez képest 38% volt. Ennek ellenére klorofill a/b arányuk hasonló értéket mutatott. Alacsony klorofill tartalmukhoz képest az asszociáció fotoszintetikus oxigéntermelése viszont meglepően magasnak bizonyult (84%). Negatív kontrollként megvizsgáltuk egy 21 napig nitrogénmentes közegen tartott algatenyésztet paramétereit is. A kisárgult tenyészet klorofilltartalma rendkívül alacsony (0,5%) volt, ennek megfelelően fotoszintetikus aktivitása is alig volt mérhető. A tenyészet klorofill a/b aránya viszont extrém magasnak (10,5) mutatkozott. (3. táblázat).

Minta	Alga mennyiség		Klorofill tartalom		Klorofill a/b arány	Fotoszintetikus oxigén termelés	
	(alga sejt/g friss tömeg)	%	(µg klorofill/ alga sejt)	%		(µg O ₂ termelés/alga sejt * s ⁻¹)	%
Kontrol alga N-tartalmú tápközegen	2*10⁹	100	1.3*10⁻⁶ ±1.2*10 ⁻⁷	100 ±9.2	2.2 ±0.2	7.0*10⁻⁷ ± 2.8*10 ⁻⁸	100 ±4
Kisárgult alga N-mentes tápközegen	3*10⁹	150	6.1*10⁻⁹ ± 3*10 ⁻¹⁰	0.5 ±0.0 2	10.5 ±1.2	9.7*10⁻⁹ ±3.4*10 ⁻¹⁰	1.4 ±3.5
C. <i>reinhardtii</i> - A. <i>vinelandii</i> - A. <i>infectoria</i> asszociáció	1.3*10⁹	65	4.9*10⁻⁷ ±3.5*10 ⁻⁸	38 ±2.7	2.3 ±0.4	5.9*10⁻⁷ ±3.25*10 ⁻⁸	84 ±5.5

3. táblázat A hármas asszociáció és az optimális valamint nitrogénszegény tápközegen tartott algatenyészetek klorofill tartalma, klorofill a/b aránya és fotoszintetikus oxigéntermelése

5.2.2.3. Az algák klorofill-protein komplexeinek vizsgálata a hármas szimbiózisban

A 77 K fluoreszcencia emissziós spektrumok analízise során megállapítottuk, hogy a szimbiózis esetében a PSII és PSI maximumok 686 és 708 nm-nél találhatók, akárcsak a kontroll, zöldalga esetében (26. A, B ábra). A PSII és PSI aránya azonban eltér a kontroll algáétól, ez az érték a szimbiózisok esetében 0,8 a kontroll 0,5 értékhez képest. A 21 napig nitrogénmentes közegen tartott, kisárgult algaanyag esetében fluoreszcens jel alig volt mérhető (26.C ábra).



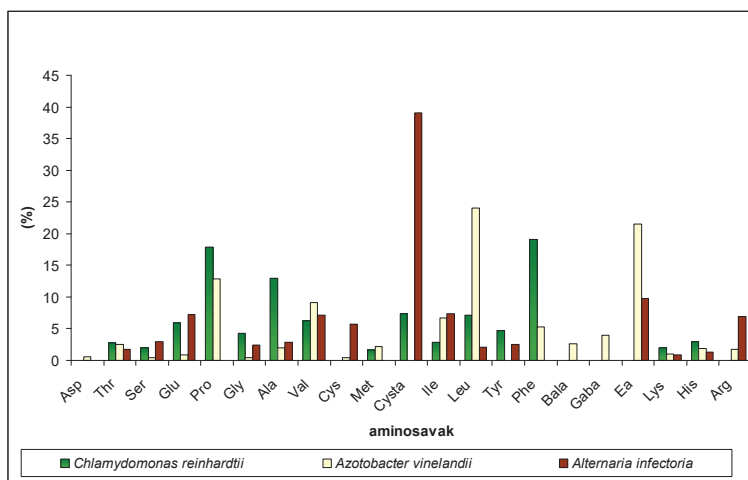
26. ábra 77 K fluoreszcencia emissziós spektrumok A) kontroll zöld alga; B) hármas szimbiózis ill. C) nitrogénmentes tápközegen kisárgult alga esetében

5.2.2.4. Aminosav analízis

A hármas asszociáció valamint az egyes törzsek által kibocsátott aminosavak meghatározásához a tenyészetek folyadék kultúráit használtuk. A baktérium, az alga valamint

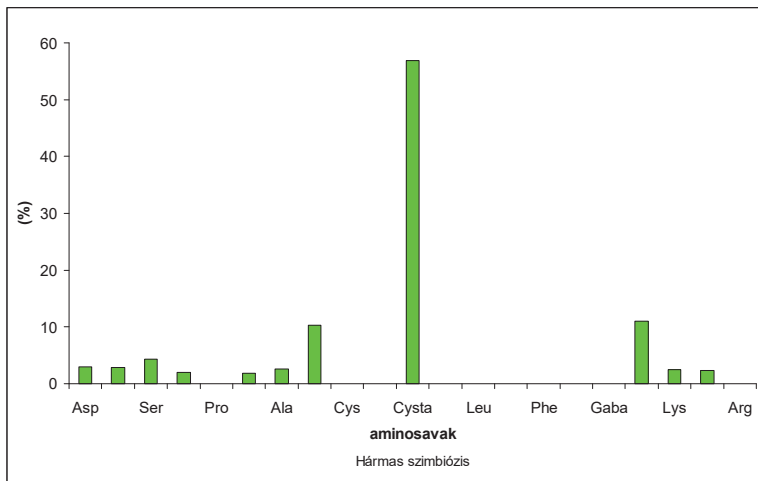
a gomba törzsek tenyészeit 4 nap, míg a szimbiózis kultúrákat két hét tenyésztés után vizsgáltuk.

A törzsek aminosav kibocsátásában jelentős különbségek figyelhetők meg (27. ábra). Az alga tenyészetek nagyobb mennyiségben termelnek prolint, alanint és fenilalanint, míg aszparagint, ciszteint, arginint, β -alanint vagy γ -aminovajsavat egyáltalán nem bocsátanak ki. Az *Azotobacter* esetében a prolin és a leucin kibocsátás aránya nagyobb, míg cisztationin és tirozin termelés egyáltalán nem jellemző. A gomba igen nagy mennyiségben (40%) állít elő cisztationint, viszont nem termel aszparagint, prolint, fenilalanint, β -alanint vagy γ -aminovajsavat.



27. ábra Az alga, baktérium és gomba törzsek által kibocsátott aminosavak százalékos aránya

A nitrogén- és szénforrásmentes körülmények között fenntartott szimbiózis esetében jóval kevesebb típusú aminosav kibocsátását detektáltuk, mint az egyes törzsek esetében (28. ábra). Nagy mennyiségben termelődik a cisztationin, míg a prolin, cisztein, metionin, leucin, izoleucin, tirozin, fenilalanin és γ -aminovajsav nem mutatható ki.



28. ábra A hármás szimbiózis által kibocsátott aminosavak százalékos eloszlása

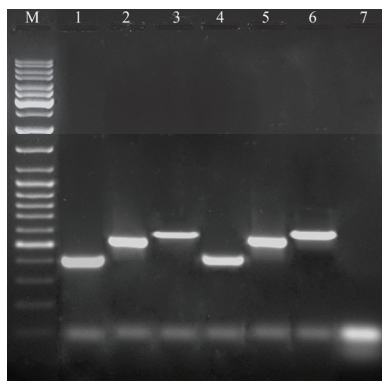
5.2.2.5. Az asszociáció partnereinek kimutatása PCR technikával

Az *Azotobacter vinelandii*-t ezonosításához nitrogénáz 3 (*anfH*) enzimjére specifikus PCR segítségével amplifikáltuk a gén 546 bp szakaszát (X. ábra). A nitrogénáz 3 enzim egy alternatív nitrogénázt kódol, melynek *anfHDGK* génje kizárólag az *A. vinelandii* törzsben fordul elő, ezért specifikus detektálására alkalmas.

A *Chlamydomonas reinhardtii* azonosításához egy 394 bp hosszúságú szakaszt amplifikáltunk a 10-es kromoszómán található *p60* katanin alegységről.

A gomba ITS szekvenciája a legtöbb hasonlóságot az *Alternaria infectoria* (*Lewia infectoria*) csoporttal mutatta. Az általunk azonosított és a GenBank-ban elhelyezett gomba és az *A. infectoria* ITS régiója között egy-két nukleotidban volt csak eltérés.

Mindhárom törzset sikerült detektálnunk PCR segítségével az asszociáció tenyészeiteiből (29. ábra).



29. ábra Az *A. vinelandii anfH* génjének, a *C. reinhardtii* 10-es kromoszómán található *p60* katin alegységének és az *A. infectoria* ITS1F és ITS4 primerek segítségével történő kimutatása PCR technikával a törzsek valamint a hármas asszociáció tenyészeiteiből. M: molekulásúly marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix); 1: *C. reinhardtii* genomi DNS; 2: *A. vinelandii* genomi DNS; 3: *A. infectoria* genomi DNS; a hármas asszociáció tenyészetéből detektált *C. reinhardtii* (4), *A. vinelandii* (5) és *A. infectoria* (6); 7: az alga, gomba és baktérium primereit tartalmazó negatív kontroll

6. DISZKUSSZIÓ

Munkánk során két különböző, mesterségesen létrehozott nitrogénkötő asszociációval dolgoztunk. Mindkét rendszerben a légköri nitrogén hasznosítására képes partner egy diazotróf baktérium, az *Azotobacter vinelandii*. A kéttagú asszociáció esetében a növényi partner egy magasabbrendű növény, a szamóca. A hármas szimbiózisban a baktériumon kívül egysejtű zöldalga (*Chlamydomonas*), mint növényi partner és gomba (*Alternaria*) van jelen.

6.1 *Fragaria x ananassa* – *Azotobacter vinelandii* asszociáció létrehozása és vizsgálata

Kísérleti rendszerünkben mesterséges asszociációt hoztunk létre a szamóca és az *Azotobacter vinelandii* között *in vitro* körülmények között. A baktériumok biztosabb beépítésére a növényi szövetekbe egy, a Növénysszervezettani Tanszéken már korábban kidolgozott, merőben új eljárást használtunk, a baktériumok biolisztikus belövését (Preininger és mti, 2001; 2003). Eredményeink azt mutatják, hogy a génpuskával történő direkt belövés következtében a baktériumok nagyobb biztonsággal épülnek be a növény regenerálódó szövetéibe. Ez azzal magyarázható, hogy a becsapódás sérüléseket okoz a növényi szövet felszínén, amely kalluszképződést indukál. Mivel a sérülések nagy mennyiségű baktériumot tartalmaznak, a helyükön fejlődő kalluszsövet illetve a direkt embriogenezissel vagy organogenezissel fejlődő regeneránsok nagy valószínűséggel tartalmazzák a belőtt *Azotobactereket*. A kifejlődött növények nitrogénmentes tápközegen életképesek, ami a szövetek között lévő baktériumok aktív nitrogénkötésére utal. Korábbi acetilén redukációs vizsgálatok igazolták a baktérium tartalmú növényben a nitrogenáz enzim működését (Preininger és mti, 2003).

A biolisztikus kezelés során keletkező sérülések scanning elektronmikroszkópos vizsgálata során megfigyeltük, hogy a mikrolövedékek által okozott kisméretű sérülések néhány vagy akár egyetlen sejtet is érinthetnek. Ennek az az oka, hogy a wolframszemcsék egy része a szétrázás és a lövedékek útjába helyezett fémrács ellenére aggregálódik, és úgy csapódik be a növényi szövetekbe. Ezek az aggregátumok több sejt átmérőjű, mélyebb sérüléseket, „krátereket” okozhatnak. Feltételezzük, hogy az ilyen módon a szövetek közé

jutott baktériumok nagyobb valószínűséggel jutnak be a növény sejtközötti tereibe a regeneráció során.

A biolisztikus kezelés után közel egy hónapig folyamatos mintavétellel nyomon követtük a belőtt baktériumok sorsát és a szövetek regenerációját. A scanning elektronmikroszkópos felvételek alapján elmondható, hogy a belövés után a sérült szövetek gyorsan, már két nap után regenerálódnak. 24 óra után a becsapódások helye még jól látható, azonban a mélyebb szöveti rétegekben már elindul a regeneráció. Két nap után a sérülések már egyáltalán nem látszanak. A belövés helyét ezután már csak az elpusztult sejtek jelzik, másrészt ezeken a területeken néhány nap elteltével elszaporodnak a felszínen maradt baktériumok. Két – három hét elteltével már csak a baktériumok jelenlétéből következtethetünk a valamikori kráterek helyére. Az *Azotobacterek* nagy mértékű szaporodása a levél felszínén azt mutatja, hogy jelentős részük túlélte a biolisztikus kezelést. Ez alapján feltételezzük, hogy a szövetekbe jutott baktériumok szintén életben maradtak és képesek elterjedni a sejtközötti terekben.

A sérülések gyógyulása mellett azt is vizsgáltuk, hogy milyen módon regenerálódnak a belőtt szamócalevelek. Fontos tudnunk a szamóca levélből történő növényregeneráció módját, mert ez jelentősen befolyásolja a belőtt baktériumok további sorsát, elterjedését a növényben. A növényregeneráció általában két fejlődési útvonalon mehet végbe, az egy sejtől kiinduló szomatikus embriogenezis vagy a több sejtől kiinduló organogenezis által. A regenerációnak ez a két típusa a regenerációs tápközegeken vagy közvetlenül a levélszövetekből indul ki (Raghavan, 1986), vagy közvetett módon, kalluszfejlődésen keresztül. A szomatikus embriók mindig egyetlen sejtől fejlődnek (Toonen és mti, 1994), és a proembriók áttörnek az epidermiszt. Ezzel ellentétben az organogenezis több sejtől álló sejtcsoportból indul ki, ahol az epidermiszsejtek is osztódnak.

Az irodalmi adatok többsége azt mutatja, hogy a szamócára elsősorban az organogenezis jellemző (Kirschbaum és mti, 2004), de néhány eredmény a szomatikus embriogenezis meglétét is igazolja (Wang és mti, 1984). Az eddigi kísérletekben azonban általában nem foglalkoztak konkrétan a regeneráció módjának megismerésével, hatásregenerációt figyeltek meg, amit morfogenezisként értékeltek (Elmansouri és mti, 1996; Passey és mti, 2003).

A felvételek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a szamóca esetében a regeneráció szomatikus embriogenezissel és organogenezissel egyaránt végbemehet. A két folyamat merőben más módon megy vébe. Az organogenezis kezdetén kiemelkedések jelennek meg a

szövetek felszínén. A primordiumok tövében megfigyelhető kutikula gyűrődések arra utalnak, hogy az embriogenezzel ellentétben, ahol a külső sejtréteg felszakad, itt az epidermiszsejtek is osztódnak a folyamat során és folytonosan borítják a képződő primordiumokat. A fejlettebb hajtáskezdemények mellett fiatalabb képleteket is megfigyeltünk, ami arra utal, hogy a regenerációs aktivitás folyamatos, egymás után jelennek meg az újabb hajtásúcscok a levél felszínén (Preininger és mti, 2006a).

A szomatikus embriogenezis a kétszikű növények közül legkönnyebben sárgarépnánál és lucernánál érhető el, sok növénynél még ma is nehezen indukálható (Attree és Fowke, 1993). A szamóca esetében azonban az általunk használt közegen szomatikus embriogenezis is megfigyelhetünk. A folyamat első lépéseként a sejtek megduzzadnak, ennek következtében felszakad a kutikula. Mivel a differenciáció a levelek mezofillumból indul, az egysejtes majd az osztódó embriogén sejtek az epidermiszt áttörik. A felvételeken nyomon követhettük az embriogenezis egyes stádiumait a néhány sejtes proembriótól a szív stádiumon keresztül egészen az érett embriók kialakulásáig. Kísérleteink során nem fordult elő nagymértékű abnormális embriófejlődés, csak elenyésző százalékban, ellentétben Lazzeri és mti (1985) valamint Finer (1988) tapasztalataival.

A mikroszkópos vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a szamóca esetében ugyanazon a levélen organogenezis és szomatikus embriogenezis egyszerre is végbemehet.

Bár az esetek többségében kalluszfejlődés nélküli, ún. közvetlen regeneráció ment végbe a szamóca leveleken, néhány esetben azonban kallusz szövet keletkezett a vágások helyén, amely primer kalluszokból a későbbiekben nem regenerálódtak hajtások.

A scanning elektronmikroszkópos felvételek megmutatták, hogy a biolisztikus kezelés során kialakult sérülések tartalmaztak baktériumokat, melyek a regeneráció során valószínűleg bejutottak a sejtközötti terekbe, arról viszont nem adnak információt, hogy a belövés során milyen mélyre sikerült bejuttatni az *Azotobactereket*.

Mivel az általunk használt *A. vinelandii* törzs *green fluorescent protein* gént tartalmaz, ezért a belőtt szamócaleveleket fluoreszcens mikroszkóppal is analizáltuk. Az epifluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek egyértelműen kimutatták a baktériumok jelenlétét a becsapódás következtében kialakult kráterekben. Ez a vizsgálat is igazolta, hogy a génpuskával nemcsak egyedi baktériumok, hanem a wolframszemcsék aggregációja miatt baktériumcsoportok is becsapódhatnak a növényi szövetekbe.

Ahhoz, hogy megtudjuk, milyen mélységben jutottak be az *Azotobacterek*, laser scanning mikroszkópos analízisre volt szükség. Ez az eszköz ugyanis optikai szeleteket készít

az adott mintáról, melyeket a megfelelő módon összeillesztve láthatóvá válik a minta térbeli szerkezete. A rétegfelvételek segítségével térbeli rekonstrukciót készítettünk egy belőtt levél vizsgálata során. A háromdimenziós felvételen a kép közepén lévő kráterben és a környező szövetekben láthatók a belőtt, fluoreszkáló baktériumok.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a baktériumok bejuttatása a növényi szövetekbe biolisztikus kezeléssel alkalmas módszer mesterséges asszociációk létrehozására. A baktériumok a regeneráció folyamán beépülnek a növény szövetéibe, így a kifejlődő új növényekbe is.

6.2 A *Chlamydomonas reinhardtii* fotoszintetikus apparátusának szerveződése és működése nitrogén elvonás és visszapótlás hatására

A szá móca-*Azotobacter* asszociáció vizsgálata során a partnerek által kibocsátott molekulák detektálása nehezen oldható meg. Ezért egy egysejtű modell rendszerrel, egy mesterségesen létrehozott alga-baktérium-gomba szimbiózissal dolgoztunk. Ez a modell asszociáció nitrogén- és szénforrásmentes körülmények között fenntartott egysejtű zöldalga *Chlamydomonas reinhardtii*, a diazotróf *Azotobacter vinelandii* valamint egy fonalas gomba, az *Alternaria infectoria* együttélése. Mivel a *Chlamydomonas* gyorsan reagál a környezeti változásokra, az asszociáció állapota, nitrogén ellátottsága ezáltal fenotípusosan is jól követhető.

Előkísérleteink során a *Chlamydomonas* egysejtű zöldalgát vizsgáltuk, mely széles körben alkalmazott kísérleti objektum olyan kutatásokban, melyek célja a fotoszintetikus apparátus biogenezésének és a különböző környezeti hatásokra történő változásának, illetve a kloroplasztisz funkciójának genetikai vizsgálata (Gyurján és mti, 1980; 1982; 1984; Hippler és mti, 1998). Munkánkban a nitrogén elvonása miatt kialakuló fokozatos klorofilltartalom- és fotoszintetikus oxigéntermelés csökkenést, valamint a klorofill-protein komplexek arányainak változását és a lebomló tilakoid membránokat is vizsgáltuk párhuzamosan. A nitrogénhiány élettani és ultrastrukturális hatásai mellett azt is kimutattuk, hogy ezek a degradációs folyamatok reverzibilisek, azaz adott mennyiségű nitrogén újbóli adagolásával vissza is fordíthatók.

Eredményeinkhez hasonlóan a nitrogénhiányos környezetben az algák, így a *Chlamydomonas* esetében is a klorofill tartalom progresszív csökkenését figyelték meg (Coleman és mti, 1988; Plumley és mti, 1989; Sinetova és mti, 2006). A fotoszintetikus oxigén termelés mérése alapján szoros korrelációt tapasztaltunk a klorofill tartalom csökkenése és a PSII aktivitása között. A két fotorendszer lebomlása különböző sebességgel zajlott, a PSII kezdetben lassabban bomlott, mint a PSI, hasonlóan *Euglena* algák sötétben öregített kloroplasztiszaiban zajló folyamatokhoz (Pancaldi, 1996). A PSII kezdeti túlsúlyát tapasztalta Plumley és Schmidt (1989) is csökkentett nitrogéntartalmú körülmények között tartott *Chlamydomonas* tenyészetekben. A 77 K fluoreszcencia spektrum alapján először a 712 nm-nél jelentkező, a PSI-hez tartozó csúcs degradációját figyeltük meg. A 15. nap után a PSII –hez tartozó, 687 nm-es csúcs bomlása egyre erőteljesebben jelentkezett, így a PSI és PSII aránya a kezdeti növekedéssel ellentétben csökkent. Ez az eredmény eltér attól a

tapasztalattól, hogy nehézfém okozta klorózis esetén elsősorban a PSII komplex sérül, sokkal inkább mint az LHCII vagy a PSI (Appenroth és mti, 2003).

A *Chlamydomonas* sárgítása során a klorofillok és pigment-protein komplexek lebomlásával párhuzamosan a tilakoid membránok dezorganizációja is megfigyelhető volt. A gránumszerű struktúra 5 nap sárgítás után már teljesen eltűnt, 8 nap után pedig csak kevés tilakoidmembrán maradt a kloroplasztiszokban, ami jól összeegyeztethető a fotoszintetikus oxigéntermelés és a PSII pigment-protein komplexek fluoreszcencia hozamának csökkenésével. Ezt támasztják alá Biswal és mti (1983) eredményei is, melyek szerint a gránum szétesés a klorofil b és LHCII mennyiségének csökkenésével jár. Szoros összefüggés van a nitrogénhiány által okozott csökkent mértékű fotoszintézis és az ultrastruktúra fellazulása között (Doncheva és mti, 2001).

A nitrogén éheztetés kezdeti szakaszában autofágiát figyeltünk meg az elektronmikroszkópos felvételeken, részlegesen emésztett sejtartalommal rendelkező vakuolumok jelentek meg az algasejtekben. Ez a jelenség jól ismert nitrogén éheztetett élesztő sejtek esetében (Onodera és Ohsumi, 2005), amelyek a szükséges aminosav szintet biztosítják ezzel a módszerrel. A folyamatot az *Atg7* gén kontrollálja. Amennyiben ezt a gént egerekben kiűtötték, az éheztetés hatására bekövetkező autofágia gyengült (Komatsu és mti, 2005).

Nitrogénmentes körülmények között a kloroplasztisz keményítő tartalma már az első nap után számottevően megemelkedett és megmaradt ezen a szinten miközben a fotoszintézis leállt. Feltételezhetően a kloroplasztiszból történő cukortranszport a sárgulás kezdetén lecsökken (Appenroth és mti, 2003), és a későbbiek folyamán a sejt működésképtelensége miatt a keményítőszemcséket nem képes hasznosítani (Nyitrai és mti, 2007).

A nitrogén éheztetés hatására még egy jelentős strukturális változást figyelhattunk meg, a sejtekben már a kezdeti szakaszban lipidcseppek jelentek meg, melyek mérete a későbbiek folyamán fokozatosan növekedett. Ezek a globulusok a plasztiszon kívül alakultak ki. Ezzel szemben a keményítőszemcsék a plasztiszban maradtak és annak deformációját okozták anélkül, hogy az organelum felszakadt volna. Hasonló jelenséget tapasztaltak *Chlorella* esetében is (Pyliotis és mti, 1975). A kloroplasztisz lipidjei valószínűleg hozzájárulnak a citoplazma lipidcseppjeinek növekedéséhez, mivel a plasztoglobulusok kiszorulhatnak a kloroplasztiszból (Guiaimé és mti, 1999). Ennek ellenére a sárgulás folyamán a plasztoglobulusok száma konstansnak bizonyult, hasonlóan az *Ankistrodesmus*-nál és a *Chlorella*-nál leírtakhoz (Mayer és Czygan, 1969). Ennek következtében egyetértünk Pyliotis és mti (1975) következtetésével, akik ezt a plasztisz transzformációt úgy tekintik, mint proplasztisz állapotba történő regressziót, amely szintén sok keményítőszemcsét

ellenben kis számú tilakoidot és plasztoglobulust tartalmaz. A lipidcseppek plasztisz eredete valószínűtlennek tűnik, ugyanakkor a citoszolban végbemenő autofágia és zsírsavszintézis, illetve az azt követő zsír/olaj előállítás az ER membránokban magyarázat lehet kialakulásuk eredetére. Ezt az elméletet alátámasztja a *Chlamydomonas* lipidtesteinek izolálása és analízise, amely során triacilglicerol (90%) és zsírsavak (10%) jelenlétét, valamint galaktolipidek hiányát mutatták ki (Wang és mti, 2009). Ez az összetétel jellemző hőstressz alatt álló algasejtek esetében és a szenescencia folyamán is (Mclean, 1968). Bár *Chlamydomonas* esetében tanulmányozták a nitrogén éheztetés hatására végbemenő génexpressziós folyamatokat (Plumley és Schmidt, 1989; Beck és Haring, 1996), a zöldalgákban bekövetkező szenescencia hátteréről nem végeztek hasonló kutatásokat. A két folyamat ilyen módon történő összevetése segíthetne megérteni a fenotípusos hasonlóságok hátterét.

Nitrogén visszapótlás hatására a *Chlamydomonas* sejtek visszazöldülése, regenerációja gyorsabb ütemben ment végbe, mint a sárgulás folyamata. A paraméterek változásait és az események sorrendjét figyelembe véve a sárgulással ellentétes tendenciájú, de nem mindig azonos ütemű élettani változások mentek végbe a visszazöldítés során.

A „kisárgult” algákat nitrogéntartalmú közegre helyezve az első órákban lényegesen nem változott az összklorofill tartalom és a fotoszintetikus oxigéntermelés sem. Ezután mindkettő a vártnak megfelelően növekedett. Százalékos növekedésük viszont a sárgulás során tapasztaltakkal ellentétben nem párhuzamosan változott. Az oxigéntermelés gyorsabb ütemben nőtt, mint a klorofilltartalom, ami arra utal, hogy a zöldülés elején a keletkező klorofill nagyobb része a kialakuló reakciócentrumokba épült be. Ezt támasztja alá a kezdetben magas, majd egyre csökkenő klorofill a/b arány is. *Chlorella* esetében a visszazöldülés 4. és 6. órája között jelentősen megnő a fotoszintetikus oxigéntermelés (Grimme és Porra, 1974). Ez a *Chlamydomonas* esetében is megfigyelhető volt, 6 óra visszazöldítés után a termelt oxigén mennyisége elérte a végső, zöld sejtek által termelt mennyiség negyedét. Ezt Grimme és Porra úgy magyarázza, hogy ekkorra már kialakultak kis hatékonysággal működő fotoszintetikus egységek, melyekbe a visszazöldülés során még több klorofill épült be. Jelentős mennyiségű klorofill csak 9 óra után (7.5%) halmozódott fel. Egy nappal a nitrogéntartalmú közegre történt visszahelyezés után a fotoszintetikus oxigéntermelés elérte a zöld sejtekre jellemző érték 60%-át, míg a klorofill tartalom csak kb. a negyedét. Az algák fotoszintetikus oxigéntermelése a visszazöldítés végére meghaladta a kontroll tenyésztetre jellemző értéket (120%), míg oxigéntermelésük 80%-os értéket mutatott.

A tilakoid rendszer is gyorsan regenerálódott, 14 óra elteltével már jól látható volt a tilakoid membránok kötegelődése, ami jól összevág a nagymértékű fotoszintetikus oxigéntermeléssel. Egy nap elteltével gránum-szerű struktúrák jelentek meg. A második napon szemmel láthatóan csökkent a keményítőszemcsék száma, és a zöldülési folyamat végére a lipidcseppek is fokozatosan eltűntek a citoplazmából.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a *Chlamydomonas reinhardtii* tenyészetek nitrogén megvonás hatására végbemenő kisárgulását a drasztikus klorofilltartalom csökkenésén túl a fotoszintetikusan aktív klorofill-protein komplexekben végbemenő jelentős minőségi és mennyiségi változások eredményezik. A folyamat során a tilakoid membránok dezorganizációját valamint lipidcseppek és keményítőtestek felhalmozódását tapasztaltuk. Nitrogén visszapótlás hatására a kloroplasztisz regenerációja figyelhető meg. A klorofill protein komplexek fokozatosan visszaépültek, ezzel párhuzamosan a lipidcseppek és keményítőszemcsék lebomlottak. A zöldülés során a fotoszintetikus aktivitás fokozatosan növekedett. A kisárgult sejtek teljes regenerációja, visszazöldülése a leépülés folyamatánál sokkal gyorsabban, 4 nap alatt végbement.

6.3 *Chlamydomonas reinhardtii* – *Azotobacter vinelandii* – *Alternaria infectoria* hármas asszociáció vizsgálata

A nitrogén számos biomolekula alkotórészeként nélkülözhetetlen minden élő szervezet számára. Legnagyobb mennyiségben az atmoszférában van jelen, azonban csak néhány baktérium képes a légköri nitrogén hasznosítására nitrogenáz enzim komplexe által. A prokarioták által megkötött nitrogén az eukarióták számára csak úgy hasznosulhat, ha a két szervezet között szorosabb vagy lazább kapcsolat (szimbiózis vagy asszociáció) jön létre. Ezekben a szimbiózisokban a gazdaszervezet növény, állat vagy gomba egyaránt lehet (Reinhold-Hurek és Hurek 1998; Hirsch és mti, 2001; Kneip és mti, 2007).

A szén- és nitrogénmentes közegen fenntartott asszociáció folyamatos fennmaradása csak úgy lehetséges, ha a partnerek szerves szén- és nitrogén vegyületeket bocsátanak ki a tápközegebe. Ezek a komponensek főleg egyszerű cukrok és aminosavak. (Vogel és mti, 1978).

Kísérleteinkben három, a természetben önállóan élő szervezet, a *Chlamydomonas* egysejtű zöld alga, a légköri nitrogént kötő *Azotobacter* és az *Alternaria* penészgomba együttélését tanulmányozzuk *in vitro* körülmények között. A mesterséges tápközeget nitrogén – és szénforrás-mentes, amely a partnerek számára külön-külön nem biztosítja az életfeltételeket. Minden átoltás után, amikor új közegre kerül a tenyészet, a szervezett struktúra felbomlik és az asszociációnak 2-3 hétre van szüksége hogy újra létrehozza azt a környezetet, ahol a partnerek szén- és nitrogénellátottsága biztosítva van. A kolónia szerkezete és növekedése csak ezután vizsgálható. Kérdés, hogyan képes a háromtagú asszociáció a két lételemet nélkülöző közegen élni, működni? Hogyan valósul meg az együttélés?

A 4. táblázat bemutatja, hogy a két tápelem megkötésében a partnerek milyen módon vehetnek részt.

Tápelem	Tápközeget	Alga	Baktérium	Gomba	Alga + gomba + baktérium
Nitrogén	-	-	+	-/?	++
Szén	-	+	-	-	++

A táblázatból is kitűnik, hogy az alga fotoszintézissel biztosítja a szén- és energiaforrást, amennyiben biztosított számára a nitrogén. Ez utóbbi hiányában a vegetatív sejt gamétává alakul. A gametogenezis során a sejtosztódás leáll, a klorofilok lebomlanak (Sears és mti, 1980; Siersma és Chiang, 1971; Martin és mti, 1976), és mindazok a degradációs folyamatok lejátszódnak, amelyek az előző alfejezetben lettek kifejtve. A baktérium képes a légkörből a nitrogént megkötni, amennyiben az energiaforrás, a cukor, rendelkezésére áll (+). Nyilvánvaló, hogy az alga-baktérium együttes képes lehet a két fontos elem (nitrogén, szén) légkörből való fixációjára, amennyiben a tápközegen keresztül kölcsönösen hozzájutnak azokhoz. Korábbi vizsgálataink (Korányi és mti, 1993; Gyurján és mti, 1995; Preininger és mti, 2006b) igazolják, hogy a *Chlamydomonas* egysejtű zöldalga és a légköri nitrogént kötő *Azotobacter* baktérium képes együttélésre nitrogén- és szénforrásmentes közegen. A vizsgálatokból kitűnik, hogy az *Azotobacter* aminosavakat bocsát ki a tápközegbe, melyek nitrogén forrásként szolgálhatnak az alga sejtek számára (Preininger és mti, 2006b). A *Chlamydomonas* zöldalga sejtek nagy számú szénvegyületet választanak ki. Ilyenek például a különböző cukrok, α -ketosavak, glikolsav, oxálsav és piroszőlősav (Allen 1956; Collins és Kalnins 1967; Vogel 1978).

Felvetődik továbbá a kérdés, milyen szerepe lehet a harmadik partnernek, a gombának az együttélésben? Első megközelítésben a gomba csak felhasználó lehet, hiszen a két fontos elem, a nitrogén és a szén megkötésében nem tud részt venni. Előzetes megfigyeléseink azonban arra engednek következtetni, hogy a gomba jelenléte pozitívan befolyásolja az alga – baktérium együttélését, amit a hármas tenyészet zöldebb színe jól mutat.

Jelen vizsgálataink arra irányultak, hogy pontosan számba vegyük az együttélést biztosító molekulákat. Ezen kívül vizsgáltuk a hárompartneres együttélés működőképességét a fotoszintézis, a légzés és a nitrogénkötés képességén keresztül.

Az általunk létrehozott és vizsgált mesterséges szimbiózis leginkább szembevető tulajdonsága feltűnően zöld színe, ami az elegendő nitrogénellátottságra utal, annak ellenére, hogy az algasejtek klorofil tartalma a kontroll zöldalga tenyészetéhez képest csak 38%. A nitrogénmentes közegen fenntartott algatenyészet klorofil tartalma viszont csak 0.5%. Watanabe és mti (2005) hasonló „sárgulási” folyamatot figyeltek meg *Chlorella* esetében a szimbiota partnerei nélkül tenyésztve, míg a kevert kultúra klorofil tartalma stabil maradt.

A 77 K fluoreszcencia emissziós mérések alapján az asszociáció esetében a klorofil molekulák a kontroll algáéhoz hasonlóan pigment-protein komplexekbe épültek be. Az

asszociációnál tapasztalt, a PSII és PSI fluoreszcens sávok amplitudójának arányában bekövetkezett növekedés részben az energiatranszferben bekövetkezett változással magyarázható (Plumley és Schmidt, 1989). A klorofill a/b arány kis mértékű, párhuzamos növekedése arra enged következtetni, hogy az asszociáció algasejtjeiben több core complex szintetizálódott, mint a kontroll alga esetében. Ez a feltételezés összhangban áll a hármas asszociáció relatív magas fotoszintetikus oxigéntermelésével, ami alapján elmondhatjuk, hogy a szimbiózis algasejtjei fiziológiailag aktívak. A kontroll *Chlamydomonas* kultúra nettó fotoszintézise méréseink alapján hasonlónak bizonyult az irodalomban fellelhető, korábban mért eredményekhez (Peltier és Schmidt, 1991). A szén- és nitrogénmentes közegen nőtt asszociációban élő *Chlamydomonas* sejtek működő fotoszintetikus apparátussal rendelkeznek; ami arra utal, hogy az *Azotobacter* partner által biztosított nitrogénforrás elegendő mennyiségű egy jól működő fotoszintetikus apparátus létrehozásához. Ezt támasztják alá az ultrastruktúrális vizsgálatok is. Az elektronmikroszkópos felvételek alapján ugyanis a szimbiózis algasejtjei, a kontroll zöld algákhoz hasonlóan, jól fejlett tilakoid membránrendszerrel rendelkeznek. A nitrogénmentes közegen tartott, kisárgult algasejtekre jellemző extrém mértékű keményítőszemcse- vagy lipidcsepp felhalmozódást nem figyeltünk meg esetükben.

Vizsgáltuk a gomba partner szerepét a hármas asszociációban. A gomba partner az ITS szekvencia analízis alapján a legtöbb hasonlóságot az *Alternaria infectoria* (*Lewia infectoria*) csoporttal mutatta. Korábbi, *Chlamydomonas* – *Azotobacter* asszociációval végzett kutatásaink alapján (Preininger és mti, 2006b) elmondható, hogy az *Alternaria infectoria*-val kiegészült hármas szimbiózis tenyésztete zöldebbnek mutatkozott és klorofill tartalma is magasabb volt a kétpartneres tenyészetéhez képest. Feltételezzük, hogy a gomba kiegészítő nitrogénforrást biztosít az alga számára, illetve a baktérium által megkötött nitrogént is könnyebben hasznosítható formává alakíthatja. A gombakolonizáció pozitív hatását már bizonyították egy működő mikorrhizás gomba-növény-baktérium együttélés esetében (Li és Hung, 1987; Azcón és mti, 1991; Paul és mti, 2007). A mikorrhiza szimbiózisokhoz társuló diazotróf baktérium is pozitív hatást fejt ki a kapcsolatra, ezért 'mikorrhiza segítő baktériumok'-ként emlegetik őket (Frey-Klett és mti, 2007).

Az aminosav analízis eredményeképpen a hármas asszociáció esetében jóval kevesebb féle aminosavat detektáltunk, mint külön – külön a törzsek tenyészteténél. Néhány aminosav, amelyet optimális körülmények között az egyes törzsek kiválasztanak a közegbe, a szén – és nitrogénmentes közegen fenntartott szimbiózis esetében nem mutatható ki. Ezen molekulák hiányának két oka lehetséges. Egyrészt a partnerek az együttélés során hasznosíthatják azokat,

kivonva ezzel teljes mértékben a táptalajból, másrészt lehetséges, hogy a részleges nitrogénhiány gátolja ezen aminosavak bioszintézisét. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény, hogy a szimbiózisban a partnerek nem állítanak elő komplex, elágazó láncú aminosavakat (Leu, Ile, Tyr, Phe) - kivételt képez az 5 szénatomos valin - ellentétben az optimális közegen nőtt tenyészetekkel. Érdeemes megjegyezni, hogy az alga és gombatenyészet által optimális közegen nagy mennyiségben termelt prolin az asszociáció esetében egyáltalán nem detektálható.

A cisztationin, amely a kéntartalmú aminosavak anyagcseréjének központi intermediere, a hármas asszociációban nagy mennyiségben termelődik. A tenyészet magas cisztationin produkciója valószínűleg a gomba metabolikus aktivitásának köszönhető. Ez a molekula az emberi agyban különösen nagy koncentrációban van jelen (Tallan és mti 1958, Okumura és mti 1960, MacCoss és mti 2001), fontos neuroprotektív hatása révén elengedhetetlen a működéséhez. Hiánya olyan súlyos betegségek kialakulásához vezethet, mint a skizofrénia, az Alzheimer vagy a Parkinson kór (Seshadri és mti 2002, White és mti 2001, Eto és mti. 2002). A cisztationin antioxidásként is működik és csökkenti az apoptózis mértékét (Wada és mti, 1995; Key és White, 2003). Az általunk használt biológiai rendszer reményt ad egy cisztationin termelésre irányuló fermentációs eljárás kidolgozására. Alkalmasságát bizonyítja, hogy a tápközegebe kibocsátott aminosavak közel 70%-a a cisztationin.

A hármas asszociáció vizsgálata során kimutattuk, hogy a szén- és nitrogénmentes közegen nőtt asszociációban élő *Chlamydomonas* sejtek működő fotoszintetikus apparátussal és jól fejlett tilakoid membránrendszerrel rendelkeznek. Mindez arra utal, hogy az *Azotobacter* partner elegendő mennyiségű nitrogénforrást biztosít számára. A gomba szerepét a rendelkezésünkre álló módszerek segítségével nem sikerült tisztázni, valószínűleg kiegészítő, illetve könnyebben hasznosítható nitrogénforrással látja el a partnereket.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során kétféle mesterségesen létrehozott nitrogénkötő asszociációt vizsgáltunk, egy magasabbrendű növényvel és egy egysejtű zöldalgával kialakított együttélést. Ennek során létrehoztunk és vizsgáltuk a szamóca (*Fragaria x ananassa*)–*Azotobacter* asszociációt valamint a *Chlamydomonas reinhardtii* – *Azotobacter vinelandii* – *Alternaria infectoria* szimbiózist.

A szamóca – *Azotobacter* asszociációval folytatott munkánk során a gfp gént tartalmazó *Azotobacter vinelandii* sejteket génpuskával sikeresen bejuttattuk a szamóca in vitro leveleibe és regenerálódó hajtáscsúcsaiba. A baktériumok sorsát epifluoreszcens, laser fluoreszcens valamint scanning elektronmikroszkóppal követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy az excizált levelekből történő növényregeneráció embriogenezissel és organogenezissel egyaránt végbemehet. A biolisztikus kezelés során a mikrohordozóhoz kapcsolt baktériumok mélyebb sérüléseket okozva a levél felszínén, valószínűleg bejutnak a szövetekbe és a regenerálódó növényekbe. A belövés utáni néhány órában még jól látható becsapódások helyén a második nap végére szövetregeneráció figyelhető meg. A sérülések helyeit néhány nap múlva már csak az elhalt sejtek és a kívül maradt baktériumok felszaporodása jelzi.

A *Chlamydomonas reinhardtii* tenyészetek nitrogén megvonás hatására végbemenő kisárgulása mögött meghúzódó drasztikus klorofilltartalom csökkenésen túl a fotoszintetikusan aktív klorofill-protein komplexekben jelentős minőségi és mennyiségi változások tapasztalhatók. A plaztisz elektronmikroszkópos szerkezetében jelentkező strukturális leépülések figyelhetők meg, amely a tilakoid membránok dezorganizációját, a lipidcseppek és a keményítőttestek felhalmozódását jelenti. Nitrogén visszapótlásos kísérleteinkben a kloroplasztisz regenerációja figyelhető meg, melynek során a klorofill képződését a fotoszintetikus aktivitás fokozatos növekedése kíséri, mely változás sokkal gyorsabb, mint a leépülés folyamata. A zöldülési folyamat során a klorofill protein komplexek visszaépültek, a lipidcseppek, és a keményítő szemcsék lebomlottak. Komplet tápközegen a kisárgult sejtek teljes visszazöldülése, regenerációja 4 nap alatt végbement.

A hármas asszociáció vizsgálata során az egyes partnerek jelenlétét PCR technikával kimutattuk. A gomba partner DNS szekvenálással történő azonosítása során *Alternaria infectoria*-nak bizonyult. A fotoszintetikus paraméterek és az ultrastruktúra vizsgálata alapján elmondható, hogy a szén- és nitrogénmentes közegen nőtt asszociációban élő *Chlamydomonas* sejtek működő fotoszintetikus apparátussal és jól fejlett tilakoid membránrendszerrel rendelkeznek. Mindez arra utal, hogy az *Azotobacter* partner elegendő mennyiségű nitrogénforrást biztosít. Az aminosav analízis során a hármas asszociáció esetében jóval kevesebb aminosavat detektáltunk, mint külön-külön az egyes törzseknél. A nagy mennyiségben termelődő cisztationin valószínűleg a gomba aktivitásának köszönhető.

8. SUMMARY

Our aim was to study the artificial bipartite association between strawberry (*Fragaria x ananassa*) and the diazotrophic bacteria *Azotobacter vinelandii*, and the artificial tripartite symbiosis involving a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*), a bacterium (*Azotobacter vinelandii*) and a fungus (*Alternaria infectoria*).

A new utilization of the biolistic gun was developed for the direct introduction of nitrogen fixing bacteria (*Azotobacter vinelandii*) into *in vitro* strawberry (*Fragaria x ananassa*) tissues. *Gfp* gene containing bacteria, adhered to tungsten particles, were delivered into the target leaves. The presence of bacteria in the developing strawberry callus tissues and regenerating plants was detected by epifluorescent-, laser fluorescent and electron microscopy. The way of the plant regeneration process from the strawberry leaves is very important to know because this influences the later results. Therefore steps of regeneration from leaf inocules on modified MS media was followed up by scanning electronmicroscopy that proved both organogenesis and embryogenesis. Regeneration process was monitored from the beginning until the formation of the leafy shoots. Also scanning electronmicroscopy was used to follow the fate of the the bombarded plant cells, injuries and surface bacteria from 30 minutes to 29 days after the biolistic treatment.

During the 3 week-long degreening process of the *Chlamydomonas reinhardtii* cells the decline of the chlorophyll content, qualitative and quantitative changes in photosynthetically active chlorophyll-protein complexes were detected. Ultrastructural degradation of the chloroplast included the disintegration of the thylakoid membranes and accumulation of lipid bodies and starch grains. During the regreening process on nitrogen-containing medium chloroplasts were regenerated when formation of chlorophyll was followed by gradual increase of photosynthetic activity. Chlorophyll-protein complexes were reorganized. Lipid bodies and starch grains were degraded. This process was much quicker then the degradation, total greening of the cells occurred in 4 days.

The green colour of tripartite association indicated that the algal cells had enough nitrogen to synthesize chlorophylls. The relatively high rate of photosynthetic oxygen evolution proved that nitrogen was effectively used for building up a well functioning photosynthetic apparatus. This was supported by the analysis of photosystems and ultrastructural investigations. In comparison with degreened algae cultured on nitrogen-free medium, the chloroplasts in the symbiont algal cells contained a well-developed, stacked thylakoid membrane system without extreme starch or lipid accumulation. Far fewer types of amino acids were excreted by the tripartite cultures than by pure cultures. Cystathionine, which is a common intermediate in the sulphur-containing amino acid metabolism, was produced in high quantities by the tripartite symbiosis. This can mostly be attributed to the activity of the fungus.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Böddi Béla tanszékvezető egyetemi tanának, hogy lehetőséget adott arra, hogy a Növénysszervezettani Tanszéken dolgozhassam, valamint a fluoriméteres mérésekben nyújtott segítségét.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Preininger Éva egyetemi adjunktusnak a lehetőségért, hogy irányítása alatt dolgozhattam, valamint a munkám során nyújtott segítőkészséget és számtalan szakmai tanácsot. Köszönettel tartozom Gyurján István professzor úrnak, aki szakmai tapasztalatával mindig mindenben segített a munkám során.

Köszönöm Kristóf Zoltán egyetemi docensnek a laser scanning mikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Sarkadi Livia egyetemi docensnek és Lőrincz Katalin technikusnak a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszékéről az aminosav összetétel meghatározásában nyújtott segítségét.

Köszönöm Kósa Annamária doktorandusznak a fluoreszcencia spektrumok feldolgozásában nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Pónyi Tamás és Kovács M. Gábor egyetemi adjunktusoknak a molekuláris munkákban nyújtott segítségüket.

Külön köszönet illeti Kálmán Ágnes asszisztent, amiért az elmúlt évek során a laborban mindenben segítségemre volt, precíz és lelkiismeretes munkájával jelentős mértékben hozzájárult a kísérletek eredményességéhez.

Az elektronmikroszkópos laborban végzett technikai munkáját köszönöm Jónás Csillának és Gergely Magdolna Katalinnak.

Köszönettel tartozom a családomnak, hogy az elmúlt években mellettem álltak, támogattak.

Köszönet illeti továbbá a Tanszék minden dolgozóját, aki kisebb vagy nagyobb mértékben hozzájárult ahhoz, hogy ez a szakdolgozat elkészülhessen.

10. IRODALMI HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- Abd-Alla, M.H., Omar, S.A. and Abdel Wahab, M.A. (1992) The role of cellulose-decomposing fungi in nitronease activity of *Azotobacter chroococcum*. *Folia Microbiologica* 37: 215-218
- Allen, M.B. (1956) Excretion of organic compounds by *Chlamydomonas*. *Archives of Microbiology* 24: 163-168
- Al-Mallah, M. K., Davey, M.R. and Cocking, E.C. (1989) Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia. *J. Exp. Bot.* 40, 473-478
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Anderson, J.M. (1999) Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 625-639
- Appenroth, K.J., Keresztes, Á., Sárvári, É., Jaglarz, A. and Fischer, W. (2003) Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrrhiza* : Electron microscopy and biochemical investigations. *Plant Biol.* 5: 315-323
- Aquilanti, L., Favilli, F. and Clementi, F. (2004) Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1475–1483
- Attree, C.L. and Fowke, L.C., (1993) Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35: 1-35
- Austin, J.R., Segui- Semarro, J.M. and Stachelin, L.A. (2006) Quantitative analysis of changes in spatil distribution and plus-end geometryof microtubulesinvolved in plant-cell cytokinesis. *J. Cell Sci.* 118: 3895-3903
- Azcón, R., Rubio, R. and Barea, J.M. (1991) Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N₂-fixation (¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist* 117: 399-404
- Baby, U.I., Baliah, N.T., Ponmurugan, P. and Premkumar, R. (2002) Effect of *Azospirillum* on nursery grown tea plants. *Proceedings of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV, Mysore, India, 10-13 December, 2002*
- Bageshwar, U.K., Raina, R. and Das, H.K (1988) Characterization of a spontaneous mutant of *Azotobacter vinelandii* in which vanadium-dependent nitrogen fixation is not inhibited by molybdenum. *FEMS Microbiology Letters* 162: 161-167
- Balandreau, J. (1983) Microbiology of the association. *Can J Microbiol* 29: 851–859

- Baldani, V.L.D. and Döbereiner, J. (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* Soil. Biol. Biochem. 12: 433-439
- Baldani, V.L.D., Alvarez, M.A. de B., Baldani, J. I. and Döbereiner, J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant Soil 90: 35-46
- Bally, R., Thomas-Bauzon, D., Heulin, T. and Balandreau, J. (1983) Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. Can. J. Microbiol. 29: 881-887
- Barraquio, W.L., Ladha, J.K. and Watanabe, I. (1983) Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. Can. J. Microbiol. 29: 867-873
- Baszynski, T., Panczyk, B., Krol, M. and Krupa, Z. (1975) The effect of nitrogen deficiency on some aspects of photosynthesis in maize leaves. Z. Pflanzenphysiol. 74: 200-207
- Beck, C.F. and Haring, M.A. (1996) Gametic differentiation of Chlamydomonas. Int. Rev. Cytol. 168: 259-302
- Benson, D.R. and Clawson, M.L. (2000) Evolution of the actinorhizal plant symbioses. In: Triplett EW (ed) Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp 207-224
- Berg, R.H., Vasil, V. and Vasil, I.K. (1979) The biology of *Azospirillum-sugarcane* association. 2. Ultrastructure. Protoplasma 101: 143-163
- Berge, O., Heulin, T. and Balandreau, J. (1991) Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. Biology and Fertility of Soils 11: 210-215
- Bertrand-Garcia, R., Walling, L. L. and Murashige, T. (1992) Analysis of polipeptides associated with shoot formation in tobacco callus cultures. Amer. J. Bot. 79: 481-487
- Biswal, B. (1995) Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 30: 3-13
- Biswal, B. (1997) Chloroplast metabolism during leaf greening and degreening. in M. Pessarakli (ed.), Handbook of Photosynthesis, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 71-81
- Biswal, U.C. and Biswal, B. (1988) Ultrastructural modification and biochemical changes during senescence of chloroplasts. Int. Rev. Cytol. 113: 271-321
- Biswal, U.C., Choudhury, N.K. and Biswal, B. (1983) Degradation of plastid membranes during senescence. In: Sen, D.N. and Kumar, S. (eds). Indian Review of Life Sciences. Vol. 3. Geobios International, India. pp. 33-61
- Bohlool, B.B., Ladha, K.J., Garrity, D.P. and George, T. (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture - A perspective. Plant and Soil 141: 1-12

- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B. and Sanford, J.C. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538
- Bradley, P.M. (1980) Co-culture of carrot cells and a green alga on medium deficient in nitrogen. *Z. Pflanzenphysiol.* 100: 65-67
- Brockwell, J., Diatloff, A., Roughly, R.J. and Date, R.A. (1982) Selection of *Rhizobia* for inoculants. In *Nitrogen Fixation in Legumes*. Ed. J. M. Vincent. pp. 173-191. Academic Press, Sydney
- Cain, J. (1965) Nitrogen utilization in 38 freshwater *Chlamydomonas* algae. *Can. J. Bot.* 43: 1367-1378
- Carlson, P.S. and Chaleff, R.S. (1974) Forced association between higher plant and bacterial cells *in vitro*. *Nature* 252: 393-395
- Carlson, P.S. and Chaleff, R.S. (1975) Heterogenous association of cells formed *in vitro*. In *Genetic Manipulations with Plant Material*. Ed. L. Ledoux. Plenum Press, pp245-261
- Carmak, I., Hengeler, C. and Marchner, H. (1994) Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *Journal of Experimental Botany* 45, 278: 1245-1250
- Cavalier-Smith, T. (1975) Electron and light microscopy of gametogenesis and gamete fusion in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 86: 1-18
- Chatjipavlidis, I., Antonakou, M., Demou, D., Flouri, F. and Balis, C. (1996) Bio-Fertilization of Olive Oil Mills Liquid Wastes. The Pilot Plant in Messinia, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38: 183-187
- Chen, T. W., Schere, S. and Boger, P. (1992) Nitrogen fixation of *Azorhizobium* in artificially induced root para-nodules in wheat. *Science in China (Series B)* 35: 1463-1469
- Chen, Z., Klockare, R. and Sundqvist, C. (1994) Origin of somatic embryogenesis in proliferating root primordia in seed derived oat callus. *Hereditas* 120: 211-216
- Chiang, K., Kates, J.R., Jones, R.F., and Sueoka, N. (1970) On the formation of a homogeneous zygotic population in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Dev Biol.* 22(4): 655-669
- Child, J.J. (1975) Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with nonleguminous plant cell cultures. *Nature* 253: 350-351
- Child, J.J. and Kurz, W. G. W. (1978) Inducing effect of plant cells on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* 24: 143-148

- Chiu, W.L., Peters, G.A., Levicille, G., Still, P.C., Cousins, S., Osborne, B. and Elhai, J. (2005) Nitrogen Deprivation Stimulates Symbiotic Gland Development in *Gunnera manicata* Plant Physiology 139: 224–230
- Christansen-Weniger, C. and Vanderleyden, J. (1994) Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. Biology and Fertility of Soils 17: 1-8
- Christiansen-Weniger, C. (1998) Endophytic Establishment of Diazotrophic Bacteria in Auxin-Induced Tumors of Cereal Crops Critical Reviews in Plant Sciences 17: 55-76
- Clylah, H. (1974) Formation and propagation of cell division centres in the epidermal layer of internodal segments of *Torenia fournieri* Lind. grown *in vitro*. Simultaneous surface observation of all the epidermal cells. Can. J. Bot. 52: 867-872
- Cocking, E.C., Al-Mallah, M.K., Benson, E., and Davey, M.R. (1990) Nodulation of non-legumes by rhizobia. In Nitrogen fixation: Achievements and Objectives. Eds. P. M. Gresshoff, L. E. Roth. G. Stacey and W.L. Newton. Chapman and Hall, New York
- Coleman, L.W., Rosen, B.H and Schwartzbach (1988) Preferential loss of chloroplast proteins in nitrogen deficient *Euglena*. Plant and Cell Physiology 29: 1007-1014
- Collins, R.P. and Kalnins, K. (1976) Keto acids produced by *Chlamydomonas reinhardtii*. Canadian Journal of Microbiology 13: 995-999
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Thomas, H. (2000) Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (eds). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. USA. pp. 1044-1099
- Davey, M.R. and Cocking, E.C. (1972) Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts. Nature 239: 455-456
- Davies, J.P. and Grossman, A R. (1998) The use of *Chlamydomonas* (chlorophyta: volvocales) as a model algal system for genome studies and the elucidation of photosynthetic processes. Journal of Phycology 34: 907-917
- de Freitas, J. (2000) Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var. Norstar) inoculated with rhizobacteria Pedobiologia 44: 97–104
- Deakin, W.J. and Broughton, W.J (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretionsystems. Nature Reviews Microbiology 7: 312-320
- Deininger W., Fuhrmann M. and Hegemann, P. (2000) Opsin evolution: out of wild green yonder? Trends Genet. 16: 158–59
- Delwiche, C.C. (1970) The nitrogen cycle. Scientific American 223: 36
- Deo, P.M. and Biswal, B. (2001) Response of senescing cotyledons of clusterbean to water stress in moderate and low light: possible photoprotective role of β -carotene. Physiol. Plant. 112: 47-54

Dhanasekar, R., Viruthagiri, T. and Sabarathinam, P.L. (2003) Poly(3-hydroxy butyrate) synthesis from a mutant strain *Azotobacter vinelandii* utilizing glucose in a batch reactor. *Biochemical Engineering Journal* 16: 1–8

Dighe, S., Raval, M. and Shah, A.K. (1986) Detection of nitrogen-fixing ability in an epiphytic orchid *Vanda testacea* (Linde) Reichb. F. *Proceedings of the National Science Academy Part B. Biological Sciences* 52: 515-518

Dixon, R. and Postgate, J. R. (1972) Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature* 237: 102-103

Dixon, R., Cheng, Q., Shen, G.F., Day, A. and Dowson-Day, M. (1997) *Nif* gene transfer and expression in chloroplasts: Prospects and problems. *Plant and Soil* 194: 193-203

Doncheva, S., Vassileva, V., Ignatov, G. and Pandev, S. (2001) Influence of nitrogen deficiency on photosynthesis and chloroplast ultrastructure of pepper plants. *Agricultural and Food Science in Finland* 10: 59-64

Dowson-Day, M., Ashurst, J.L., Watts, J., Dixon, R.A. and Merrick, M.J. (1991) Studies on the potential for expression of nitrogenase Fe-protein in cells of higher plants. In *Nitrogen fixation*. Eds. M. Polsinelli, R. Materassi and M. Vincenzini. pp 659-669. Kluwer Academic Publ., Dodrecht.

Döbereiner, J. (1961) Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil* 15: 211-216

Döbereiner, J. and Day, J.M. (1976) Associative symbioses in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In *Proceedings of the 1st International Symposium on N₂ Fixation*. Eds. W. E. Newton and C. J. Nyman. pp. 518-538. Washington State University Press. Pullmann, Washington

Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Olivares, F.L. and Reis, V.M. (1994) Endophytic diazotrophs: The key to graminaceous plants. In *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. Eds N. A. Hegazi et al. pp. 395-408. American University in Cairo Press. Cairo. Egypt.

Döbereiner, J., Reis, V. and Lazarine, A.C. (1988) A new N₂-fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Eds H. Bothe és mti. pp. 717-722. Gustev Fisher. Stuttgart.

Dreyfus, B., Garcia, L. and Gillis, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 89-98

Dudits, D., Bögre, L., Györgyey, J. (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell. Science* 99: 473-482

- Ehaliotis, C., Papadopoulou, K., Kotsou, M., Mari, I., and Balis, C. (1999) Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 301-311
- Elmansouri, I., Mercado, J.A., Valpuesta, V., LopezAranda, J.M., PliegoAlfaro, F. and Quesada, M.A. (1996) Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L Plant Cell Reports 15 (8): 642-646
- Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T. and Kimura, H. (2002) Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293: 1485-1488
- Faria, S.M., de Lewis, G.P., Sprent, J.I. and Sutherland, J.M. (1989) Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist* 111: 607-619
- Ferris, P.J., Armbrust, E.V. and Goodenough, U.W. (2002) Genetic structure of the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 160: 181-200
- Ferris, P.J., Waffenschmidt, S., Umen, J.G., Lin, H. and Lee, J.H. (2005) Plus and minus sexual agglutinins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 17: 597-615
- Finer, J.J. (1994) Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: Dixon RA, Gonzales RA(eds) *Plant cell culture: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp.66-102
- Franssen, H.L., Vijn, I., Yang, W.C. and Bisseling, T. (1992) Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology* 19: 89-107
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176: 22-36
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M. and Szczyglowski, K. (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science* 13: 115-120
- Gallon, J. R. and Chaplin, A. E. (1987) *An Introduction to Nitrogen Fixation*. Cassel, London.
- Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J.B., Linford, A.S., Nájera, R., Castaneda, M., Guzmán, J., Espín, G. and Soberón-Chávez, G. (2004) Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiology Letters* 238: 199-206
- Garcia-Bilbao, J.L., Curiel, M.G., Celaa-Castro, M.V. and Amat-Guerri, F. (1987) Production of 3-IAA in *Azotobacter vinelandii* cultures supplemented with tryptophan, tryptamine and other indoles. *Anales de Edafologia y Agrobiologia* 46: 485-498
- Giles, K.L. and Whitehead, H.C.M. (1976) Uptake and continued metabolic activity of *Azotobacter* within fungal protoplasts. *Science* 193, 1125-1126

- Giles, K.L. and Whitehead, H.C.M. (1977) The localization of introduced *Azotobacter* cells within the mycelium of a modified mycorrhiza (*Rhizopogon*) capable of nitrogen fixation. *Plant Sci. Letters*, 10, 367-372
- Gonzales-Lopez, J., Martinez Toledo, M.V., Reina, S., Salmeron, V. (1991) Root exudates of maize on production of auxins, gibberellins, cytokinins, amino acids and vitamins by *azotobacter chroococcum* chemically defined media and dialysed soil media. *Toxicology and Environmental Chemistry* 33: 69–78
- Gonzalez-Lopez, J., Salmerin, V., Moreno, J. and Ramos-Cormenzana, A. (1983) Amino acids and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 711-713
- Goodenough, U., Lin, H. and Lee, J.H. (2007) Sex determination in *Chlamydomonas* *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 350-361
- Goodenough, U.W. and Levine, R.P. (1969) Chloroplast ultrastructure in mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking components of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology* 44: 990-1000
- Gresshoff, P. M. (1981) Amide metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Microbiol.* 128: 303-306
- Grimme, L. H. and Porra, R. J. (1974) The regreening of nitrogen-deficient *Chlorella fusca* I. The development of photosynthetic activity during the synchronous regreening of nitrogen-deficient *Chlorella*. *Archives of Microbiology* 99: 173-179
- Guérin-Dumartrait, E., Mihara, S. and Moyse, A. (1970) Composition de *Chlorella pyrenoidosa*, structure des cellules et de leurs lamelles chloroplastiques, en fonction de la carence en azote et de la levée de carence *Can. J. Bot.* 48: 1147–1154
- Guaiamét, J.J., Pichersky, E and Noodén, L.D. (1999) Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 40: 986-992
- Gusev, M.V., Butenko, R.G., Korzhenevskaya, T.G., Lobacova, E.S. and Baulina, O.I. (1980) Intercellular symbiosis of suspension ginseng culture cells and cyanobacteria. *Eur. J. Cell Biol.* 22: 503
- Gusev, M.V., Korzhenevskaya, T.G., Pyvovarova, L.V., Baulina, O.I., and Butenko, R.G. (1986) Introduction of a nitrogen-fixing cyanobacterium into tobacco shoot regenerates. *Planta* 167: 1-8
- Gutman, B.L. and Niyogi, K.K. (2004) *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*. A Dynamic Duo. *Plant Physiology* 135: 607-610
- Gyurján I., Korányi P. and Pales Gy. (1992) Ultrastructural analysis of an artificial alga bacterium intracellular symbiosis after prolonged cultivation. *Symbiosis* 14: 475-484

- Gyurján, I., Erdős, G., Keresztes, Á., Schróth, Á. and Szigeti, Z. (1980) Photosynthetic functions and structure in pigment-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetica* 14: 12-16
- Gyurján, I., Erdős, G., Paless, Gy., Nagy, A.H. and Popova, A. (1984) Analyses of thylakoid membrane polypeptides from photosystem I and II deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by two-dimensional electrophoresis. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 179: 585-592
- Gyurján, I., Korányi, P., Preininger, É., Varga, Sz.S. and Paless, Gy. (1995) Artificial plant -*Azotobacter* symbiosis for atmospheric nitrogen fixation. In: *Azospirillum VI and Related Microorganisms*. NATO ASI Series, Series G. "Ecological Sciences", vol. 37. Fendrik, I., del Gallo, M., Vanderleyden, J., Zamaroczy, M., eds. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, pp. 401-413
- Gyurján, I., Nagy, A.H., Erdős, G., Paless, Gy., Keresztes, Á., Kovács, P. and Szigeti, Z. (1982) Photosynthetic functions and thylakoid membrane polipeptide composition in light-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 3: 255-271
- Haberlandt, G. (1902) Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Math.-Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien.* 111: 69-92
- Halsall, D.M. (1993) Inoculation of wheat straw to enhance lignocellulose breakdown and associated nitrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 419-429
- Hardy, R.W.F. (1993) In *Agriculture and Environmental Challenges*. Eds. U. P. Srivastava and H. Alderman. The World Bank, Washington Dc. USA
- Hardy, R.W.F. and Eaglesham, A.R.J. (1995) Ecology and agricultural applications of nitrogen fixing systems: overview. In *Nitrogen fixation: Fundamentals and applications*. Eds. A. Tikhonovich et al. pp. 619-620. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Harris, E.H. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 52: 363-406
- Hastings, P.J., Levine, E.E., Cosbey, E., Hudock, M.O., Gillham, N.W., Surzycki, S.J., Loppes, R. and Levine, R.P. (1965) The linkage groups of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microb. Genet. Bull.* 23: 17-19
- Herder, G.D. and Parniske, M. (2009) The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 491-499
- Herman C.A., Im C.S. and Beale, S.I. (1999) Light-regulated expression of the *gsa* gene encoding the chlorophyll biosynthetic enzyme glutamate 1-semialdehyde aminotransferase in carotenoid-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Plant Mol. Biol.* 39: 289-97
- Hicks, G.S. (1980) Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Bot. Rev.* 46: 1-23

- Hippler, M., Redding, K. and Rochaix, J.D. (1998) Chlamydomonas genetics: A tool for the study of bioenergetic pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1367: 1–62
- Hirsch, A.M., Fang, Y., Asad, S. and Kapulnik, Y. (1997) The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and Soil* 194, 171-184
- Holsten, R.D., Burns, R.C., Hardy, R.W. and Herbert, R.R. (1971) Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. *Nature* 232: 173-176
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 553–78
- Hudak, J. (1981) Plastid senescence. 1. Changes of chloroplast structure during natural senescence in cotyledons of *Sinapis alba* L., *Photosynthetica*, 15: 174-178
- Imase, M., Watanabe, K., Aoyagi, H. and Tanaka, H. (2008) Construction of an artificial symbiotic community using a *Chlorella*-symbiont association as a model. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 273-282
- Jakucs, E., Kovács, G.M., Szedlay, Gy. and Erős-Honti, Zs. (2005) Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. *Mycorrhiza* 15: 459-470
- James, E.K. (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197-209
- Johnston, S.A., Aziano, P.Q., Sharc, K., Sanford, J.C., Butow, R.A. (1988) Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240: 1538-1541
- Jones, K. and Bangs, D. (1985) Nitrogen fixation by free living heterotrophic bacteria in an oak forest: The effect of liming. *Soil Microbiology and Biochemistry* 17: 705-710
- Kargi, F. and Ozmişçi, S. (2004) Batch biological treatment of nitrogen deficient synthetic wastewater using *Azotobacter* supplemented activated sludge. *Bioresource Technology* 94: 113–117
- Karube, I., Matsunaga, T., Otomine, Y., Suzuki, S. (1981) Nitrogen fixation by mobilized *Azotobacter chroococcum*. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 309-312
- Kates, J.R. and Jones, R.F. (1964) The control of gametic differentiation in liquid cultures of *Chlamydomonas*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 63: 157-164
- Kathir, P., LaVoie, M., Brazelton, W.J., Haas, N.A., Lefebvre, P.A. and Silflow C.D. (2003) Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. *Eukaryotic Cell* 2: 362-379
- Katupitiya, S., New, P.B., Elmerich, C. and Kennedy, I.R. (1995) Improved N₂ fixation in 2,4-D treated roots associated with *Azospirillum lipoferum*: Studies of colonization using reporter genes. *Soil Biol. Biochem.* 27, 447-452

- Kawakami, N. and Watanabe, A. (1993) Translatable mRNAs for chloroplast targeted proteins in detached radish cotyledons during senescence in darkness. *Plant Cell Physiol.* 34: 697-704
- Kayim, M., Koc, K.N. (2006) The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture *Scientia Horticulturae* 109: 29-34
- Keeney, D. (1982) Nitrogen management for maximum efficiency and minimum pollution. In *Nitrogen is Agricultural Soils*. Ed. F. J. Stevenson. Agronomy Monograph 22. pp 605-649. ASA, Madison, WI.
- Kennedy, I.R. and Tchan, Y.T. (1992) Biological nitrogen fixation in non leguminous crops: Recent advances. *Plant and Soil* 141: 93-118
- Kennedy, I.R., Pereg-Gerk, L.L., Wood, C., Deaker, R., Gilchrist, K. and Katupitiya, S. (1997) Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil* 194: 65-79
- Kennedy, I.R., Zeman, A., Tchan, Y.T., New, P.B., Sriskandarajah, S. and Nie, Y.F. (1990) Biological nitrogen fixation and prospects for yield increases in wheat. *Trans. 14th. Int. Contr. Soil Sci. III*, 146-151
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A and Kecskés, M.L. (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1229-1244
- Kessler, F. Schnell, D. and Blobel, G. (1999). Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208: 107-113
- Key, B.J. and White, R.P. (1970) Neuropharmacological comparison of cystathionine, cysteine, homoserine and alpha-ketobutyric acid in cats. *Neuropharmacology* 9: 349-357
- Kindle, K.L., Schell, R.A., Fernandez, E. and Lefebvre, P.A. (1989) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.* 109: 2589-2601
- Kirschbaum, D.S., Cantliffe, D.J., Shaw, N.L. and Liu, J.R. (2004) Direct adventitious shoot formation on seedling radicles in seed cultures of strawberry *Journal of Plant Biology* 47 (2): 160-162
- Klyachko-Gurvich, G.L., Zhukova, T.S., Vladimirova, M.G. and Kurnosova, T.A. (1969) Comparative characteristics of growth and biosynthesis direction in various *Chlorella* strains under nitrogen deficiency: III. Fatty acid biosynthesis. *Fiziol. Rast.* 16: 205
- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C. and Maier, U.G. (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* 7:55
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. and Chiba, T. (2005)

Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169: 425-434

Korányi, P., Varga, Sz.S., Preiniger, É. and Gyurján, I. (1993) Symbiotic integration of diazotrophic bacteria with plant cells in artificial cytobioses. In: *Endocytobiology* V. Sato, S., Ishida, M. and Ishikawa, H., eds. Tübingen Univ. Press, Tübingen, pp. 465-472

Kovács, G.M., Vágvölgyi, Cs. and Oberwinkler, F. (2003) In vitro interaction of the truffle *Terfezia terfezioides* with *Robinia pseudoacacia* and *Helianthemum ovatum*. *Folia Microbiologica* 48: 369-378

Kumar, V. (1994) Effect of *Azotobacter chroococcum* on Indian mustard growth in different soil environment. *Crop Research (Hisar)* 7. 446-450

Kumar, V., Behl, R.K. and Narula, N. (2001) Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions *Microbiol. Res.* 156: 87–93

Kutik, J., Cincero, A. and Dvorak, M. (1993) Chloroplast ultrastructural development during the ontogeny of the second leaf of wheat under nitrogen deficiency. *Photosynthetica* 28: 447-453

Kutik, J., Natr, L., Demmers-Derks, H.H. and Lawlor, D.W. (1995) Chloroplast ultrastructure of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) cultivated in normal and elevated CO₂ concentrations with two contrasted nitrogen supplies. *Journal of Experimental Botany* 46, 293: 1797-1802

Ladha, J.K., Barraquio, W.L. and Watanabe, I. (1983) Isolation and identification of nitrogen fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella panticola* associated with rice plants. *Can. J. Microbiol.* 29: 1301-1308

Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. and Amarger, A. (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981–993

LaRoche, J. and Breitbarth, E. (2005) Importance of the diazotrophs as a source of new nitrogen in the ocean. *Journal of Sea Research* 53: 67– 91

Lawlor, D.W., Kontturi, M and Young, A.T. (1989) Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany* 40: 43-52

Lazzieri, P.A., Hildebrand, D.F. and Collins, G.B. (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep* 3: 160-167

Lechno-Yossef, S. and Nierzwicki-Bauer, S.A. (2002) *Azolla-Anabaena azollae* symbiosis. In: Rai AN, Bergman B, Rasmussen U (eds) *Cyanobacteria in symbiosis*. Kluwer academic publishers, Dordrecht, pp 153–178

- Li, C.Y. and Hung, L.L. (1987) Nitrogen-fixing (acetylene-reducing) bacteria associated with ectomycorrhizae of Douglas-fir. *Plant and Soil* 98: 425-428
- Lichtentaler, H.K. (1973) Regulation der Lipochinonsynthese in Chloroplasten. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 313-329
- Lichtentaler, H.K. and Weinert, H. (1970) Die Beziehungen zwischen Lipochinonsynthese und Plastoglobulibildung in den Chloroplasten von *Ficus elastica* Roxb. *Z. Naturforsch.* 25b: 619-623
- Lin, H. and Goodenough, U.W. (2007) Gametogenesis in the *Chlamydomonas reinhardtii* minus mating type is controlled by two genes, *MID* and *MTD1*. *Genetics* 176: 913-925
- Long, S. (1989) *Rhizobium* genetics. *Ann. Rev. Genet.* 23: 483-506
- Lopez-Ruiz, A., Verbelen, J.P., Roldan, J.M. and Diez, J. (1985) Nitrate reductase of green algae is located in the pyrenoid. *Plant Physiol.* 79: 1006-1010
- MacCoss, M.J., Fukagawa, N.K. and Matthews, D.E. (2001) Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: 947-955
- Maekawa, T., Maekawa-Yoshikawa, M., Takeda, N., Imaizumi-Anraku, H., Murooka, Y. and Hayashi, M. (2009) Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* 58: 183-194
- Mansfield, S.G. and Briarty, L.G. (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69: 461-476
- Marek, L.F. and Stewart, C.R. (1992) Photosynthesis and respiration in presenescent, senescent and rejuvenated soybean cotyledons. *Plant Physiology* 98: 694-699
- Margulis, L. (1981) *Symbiosis in Cell Evolution*, Freeman, San Francisco.
- Markmann, K. and Parniske, M. (2008) Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends in Plant Science* 14: 77-86
- Martin, N.C. and Goodenough, U.W. (1975) Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii* I. Production of gametes and their fine structure. *J. Cell Biol.* 67: 587-605
- Martin, N.C., Chiang, K.S. and Goodenough, U.W. (1976) Turnover of chloroplast and cytoplasmic ribosomes during gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Developmental Biology* 51: 190-201
- Martinez-Toledo, M.V., de la Rubia, T., Moreno, J. and Gonzalez-Lopez, J. (1988) Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant and Soil* 110, 149-152
- Martinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., de la Rubia, T. and Ramos-Cormenzana, A. (1985) Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *Zea mays*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 197-204

- Mathesius, U. (2008) Auxin: at the root of nodule development? *Functional Plant Biology*, 35: 651–668
- Matile, P. (1992) Chloroplast senescence. In: Baker, N. and Thomas, H. (eds). *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants*. Elsevier, Amsterdam. pp. 413–440
- Mayer, F. and Czygan, F.C. (1969) Änderungen der Ultrastrukturen in den Grünalgen *Ankistrodesmus braunii* und *Chlorella fusca* var. *rubescens* bei Stickstoffmangel. *Planta* 86: 175-185
- McLean, R.J. (1968) Ultrastructure of *Spongiochloris typica* during senescence. *Journal of Phycology* 4: 277-283
- McVittie, A. (1972) Flagellum mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Gen. Microbiol.* 71: 525-540
- Meinzer, F.C and Zhu, J. (1998) Nitrogen stress reduces the efficiency of the C₄ CO₂ concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. *Journal of Experimental Botany* 49: 1227-1234
- Moewus, F. (1938) Vererbung des Geschlechts bei *Chlamydomonas eugametos* und verwandten Arten. *Biol. Zentralb.* 58: 516-536
- Moreira, F.M.S., Cruz, L., de Faria, S.M., Marsh, T., Martínez-Romero, E., Pedrosa, F.O., Pitard, R. M. and Young, P.J.W. (2006) *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 197–206
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Murata, N., Nishimura, M. and Takamiya, A. (1966) Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. III. Emission and actionspectra of fluorescence – three emission bands of chlorophyll *a* and the energy transfer between two pigment systems. *Biochim Biophys Acta* 126: 234–243
- Newton, J. W., Wilson, P. W. and Burris, R. H. (1953) Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Biol. Chem.* 204: 445-451
- Nghia, N.H., Gyurján, I., Stefanovits, P., Paless, Gy., and Bóka, K. (1987) Mechanisms of the uptake of *Azotobacter* cells into algal protoplasts and the fate of the bacterial cells. *Endocyt. C. Res.* 4: 63-68
- Nie, Y.F. (1983) Studies on induced nodulation by 2,4-D on non-legumes. *Nature Journal (Chinese)* 5: 326-336
- Nyitrai, P., Mayer, M., Óvári, M. and Keresztes, Á. (2007) Involvement of the phosphoinositide signaling pathway in the anti-senescence effect of low-concentration stressors on detached barley leaves. *Plant Biol.* 9: 420-426

- Oh-Hama, T., Shihira-Ishikawa, I. and Hase, E. (1965) Development of photosynthetic activities during the process of chloroplast formation in *Chlorella protothecoides*. Plant and Cell Physiology 6: 743-760
- Ohta, H. and Hattori, T. (1983) *Agromonas oligotrophica* gen. nov., sp. no., a nitrogen - fixing oligotrophic bacterium. Antonie Leeuwenhoek 49: 429-446
- Okumura, N., Otsuki, S. and Kameyama, A. (1960) Studies on free amino acids in human brain. The Journal of Biochemistry 47: 315-320
- Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. J. Biol Chem. 280: 31582-31586
- Oshio, Y. and Hase, E. (1972) Changes in ribulose 1,5-diphosphate carboxylase level during processes of degeneration and regeneration of chloroplasts in *Chlorella protothecoides*. Plant Cell Physiol. 13: 955-963
- Ossenbühl, F., Göhre, V., Meurer, J., Krieger-Liszkay, A. Rochaix J-D. and Eichacker, L. (2004) Efficient Assembly of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* Requires Alb3.1p, a Homolog of Arabidopsis ALBINO3. The Plant Cell 16: 1790-1800
- Pacios-Bras, C., van der Burgt, Y.E.M., Deelder, A.M., Vinuesa, P., Werner, D. and Spalink, H.P. (2002) Novel lipochitin oligosaccharide structures produced by *Rhizobium etli* KIM5s. Carbohydrates Research 337: 1193-1202
- Palleroni, N.J. (1984) Gram negative aerobic rods and cocci. In: Krieg, N.R., (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 140-199
- Pancaldi, S., Bonora, A., Dall'Olio, G., Bruni, A and Fasulo M. (1996) Ageing of *Euglena* chloroplast *in vitro*. I. Variations in pigment pattern and in morphology. Journal of Experimental Botany 47: 49-60
- Paracer S. and Ahmadjian V. (2000) Symbiosis. An Introduction to Biological Associations Oxford University Press pp. 65-77
- Pascher, A. (1918) Über die Beziehung der Reduktionsteilung zur Mendelschen Spaltung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 36: 163-168
- Passey, A.J., Barrett, K.J. and James, D.J. (2003) Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types Pant Cell Reports 21 (5): 397-401
- Patriquin, D.G., and Döbereiner, J. (1978) Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the indorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol. 24: 734-742

- Paul, E.A. (1988) Towards the year 2000 / directions for future nitrogen research. In *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. Ed J. R. Wilson. pp 181-217. Academic Press, Orlando, USA.
- Paul, L.R., Chapman, B.K. and Chanway, C.P. (2007) Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Ann. Bot.* 99: 1001-1009
- Peltier, G. and Schmidt, G.W. (1991) Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4791-4795
- Pence, V.L., Novick, N.J., Ozias-Akins, P. and Vasil, I.K. (1982) Induction of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* by conditioned medium from cell suspension cultures of *Pennisetum americanum* (Pearl Millet) and *Panicum maximum* (Guinea Grass). *Z. Pflanzenphysiol.* 106, 139-147
- Peoples, M.B. and Craswell, E.T. (1992) Biological nitrogen fixation: Investment, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil*, 141: 13-39
- Peoples, M.B., Beilharz, V.C., Waters, S.P., Simpson, R.G and Dalling, M.J. (1980) Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Planta* 149: 241-251
- Pineda, M.E., Fernández, E. and Cárdenas, J. (1984) Urate oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* 62: 453-457
- Plumley, F.G. and Schmidt, G. (1989) Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:2678-2682
- Pohl, P., Passig, T. and Wagner, H. (1970) Über den einfluss von anorganischem stickstoff-gehalt in der nährlösung auf die fettsäure-biosynthese in grünalgen. *Phytochemistry* 10: 1505-1513
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedmann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975: 384-394
- Prankevicus, A.B., and Cameron, D.M. (1989) Free-living dinitrogen-fixing bacteria in the leaf of northern pitcher plant (*Sarracenia purpurea*). *Nat. Can. (Que)*. 116: 245-249
- Preininger, É., Bóka, K., Korányi, P. and Gyurján, I. (2001) Introduction of the atmospheric nitrogen fixing ability to plants: direct bacterium bombardment. *Acta Horticulturae* 560: 113-116
- Preininger, É., Bóka, K., Ponyi, T., Korányi, P., Zatykó, J. and Gyurján, I. (2003) A new approach for the biolistic method: bombardment of living nitrogen fixing bacteria into plant tissues. *In Vitro Cellular and Developmental Biology — PLANT* 39(5): 443-449

- Preininger, É., Kristóf, Z., Lőrincz, Zs. and Gyurján, I. (2006a) Morfogenezis in *Fragaria* tissue culture after biolistic treatment with nitrogen fixing bacteria Acta Horticulturae 725: 221-225
- Preininger, É., Pónyi, T., Sarkadi, L., Nyitrai, P. and Gyurján, I. (2006b) Long-living *Azotobacter-Chlamydomonas* association as a model system for plant-microbe interactions. Symbiosis 42: 45-50
- Purchase, B.S. (1980) Nitrogen fixation associated with sugarcane. Proc. S. Afr. Sugar Technol. Assoc., June. pp 173-176
- Pylotiotis, N.A. and Goodchild, D.J. (1975) The regreening of nitrogen-deficient *Chlorella fusca* II. Structural changes during synchronous regreening. Archives of microbiology 103: 259-270
- Quispel, A. (1991) A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. Plant and Soil 137: 1-11
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S. and Stougaard, J. (2007) *LysM* domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. The EMBO Journal 26: 3923-3935
- Raghavan, V. (1986) Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. Cambridge University Press, New York
- Rahat, M. and Reich, V. (1986) Algal endosymbiosis in brown hydra: host/symbiont specificity. J. Cell Sci 86: 273-286
- Rasmussen, J.L., Kikkert, J.R., Roy, M.K. and Sanford, J.C. (1994) Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. Plant Cell Reports 13: 212-217
- Reger, B.J. and Krauss, R.W. (1970) The photosynthetic response to a shift in the chlorophyll *a* to chlorophyll *b* ratio of *Chlorella*. Plant Physiology 46: 568-575
- Reinert, J. (1958) Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta 53: 318-333
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (1993) Capacities of *Azoarcus* sp., a new genus of grass-associated diazotrophs. In New Horizons in Nitrogen Fixation. Eds. R. Palacios et al. pp 691-694. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol 6:139-144
- Revillas, J.J., Rodealas, B., Pozo, C., Martinez-Toledo, M.V. and Gonzalez-Lopez, J. (2000) Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. Journal of Applied Microbiology 89: 483-493

- Rhiel, R., Krupinska, K. and Wehrmeyer, W. (1986). Effects of nitrogen starvation on the function and organization of the photosynthetic membranes in *Cryptomonas maculata* (Cryptophyceae). *Planta* 169: 361-369
- Rodelas, B., González-López, J., Pozo, C., Salmerón, V. and Martínez-Toledo, M.V. (1999) Response of Faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Applied Soil Ecology* 12: 51-59
- Sager, R. and Granick, S. (1953) Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 56: 831-838
- Sahrawat, A.K. and Chand, S. (2004) High frequency plant regeneration from coleoptile tissue of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Science* 167: 27–34
- Sahrawat, A.K., Becker, D., Lütticke, S. and Lörz, H. (2003) Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. *Plant Science* 165: 1147-1168
- Sanford, J.C. (1988) The biolistic process. *Trend Biotechnol.* 6: 299-302
- Schlessman, J.L., Woo, D., Joshua-Tor, L., Howard, J.B. and Rees, D.C. (1998) Conformational Variability in Structures of the Nitrogenase Iron Proteins from *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *J. Mol. Biol* 280: 669-685
- Schmidt, M. and Hartmann, A. (2007) Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic α and β Proteobacteria. In: Elmerich C, Newton WE (eds) *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer, Dordrecht, pp 41–71
- Schötz, F., Bathelt, H., Arnold, C.G. and Schimmer, O. (1972) Die Architektur und Organisation der *Chlamydomonas*-Zelle. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von Serienschnitten und der daraus resultierenden dreidimensionalen Rekonstruktion. *Protoplasma* 75:229-254
- Schwendener, S. (1867) Über die wahre Natur der Flechten. *Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft* 51: 88-90
- Scott, T.K. (1984) Hormon regulation of development II — *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 10, Scott, T. K., ed. Springer, Berlin.
- Scotti, C., Torchio, P., Molinari, M. and Polinelli, E. (1993) Nitrogen fixing bacteria isolated from the rhizosphere of *Lolium multiflorum*: Characterization of the strains. *Journal of Genetics and Breeding* 47: 107-114
- Sears, B.B., Boynton, J.E. and Gillham, N.W. (1980) The effect of gametogenesis regimes on the chloroplast genetic system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 96: 95-114

- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W. and Wolf, P.A. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 346: 476-483
- Shah, S. Karkhanis, V. and Desai, A. (1992) Isolation and characterisation of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Current Microbiology* 25: 347-351
- Shantharam, S. and Mattoo, A. K. (1997) Enhancing biological nitrogen fixation: An appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant and Soil* 194: 205-216
- Shihira-Ishikawa, I. and Hase, E. (1964) Nutritional control of cell pigmentation in *Chlorella protothecoides* with special reference to the degeneration of chloroplast induced by glucose. *Plant Cell Physiol.* 5: 227-240
- Siersma, P.W. and Chiang, K.S. (1971) Conservation and degradation of cytoplasmic and chloroplast ribosomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* 58: 167-185
- Siersma, P.W. and Chiang, K.S. (1971) Conservation and degradation of cytoplasmic and chloroplast ribosomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* 58: 167-185
- Sinetova, M., Markelova, A. and Los, D. (2006) The effect on nitrogen starvation on the ultrastructure and pigment composition of chloroplasts in the acidothermophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 153-162
- Singh, N.D, Sahoo, L., Sarin, N.B. and Jaiwal, P.K. (2003) The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) *Plant Physiol* 99: 1704-1707
- Sitte, P. (1977) Chromoplasten-bunte objekte der modernen zell biologie. *Biol. Uns. Zeit* 7: 65-74
- Skoog, F. and Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131
- Smart, C.M. (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126: 419-448
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Tak, T., Goosen de Roo, L., Pees, E., Van Brussel, A.A.N. and Lugtenberg, E.J.J. (1989) Symbiotic properties of *Rhizpbium* containing a flavonoid-independent hybrid *nod D* product. *J. Bacteriol.* 171: 4045-4053
- Sreevidya, V.S., Rowena, J., Hernandez, O., Rollando, B.S. , Sullia, S.B., Stacey, G., Ladha, K.J. and Reddy, P.M. (2005) Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Science* 169: 726-736
- Sriskandarajah, S., Kennedy, I.R., Yu, D. and Tchan, Y.T. (1993) Effects of plant growth regulators on acetylene reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. *Plant and Soil* 153: 165-178

- Steward, F.C., Mapes, M.O., Kent, A.E. and Holsten, R.D. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown freely from suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-709
- Summerer, M., Sonntag, B. and Sommaruga, R. (2007) An experimental test of the symbiosis specificity between the ciliate *Paramecium bursaria* and strains of the unicellular green alga *Chlorella*. *Environ Microbiol* 9: 2117-2122
- Sundqvist, C., Bjorn, L.O. and Virgin, H.I. (1980) Factors in chloroplast differentiation. In: Reinert, J. (ed). Results in cell differentiation. Vol. 10. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. P. 202-224
- Suzuki, A., Yamashita, K., Ishihara, M., Nakahara, K., Abe, M., Kucho, K., Uchiumi, T., Higashi, S. and Arima, S. (2008) Enhanced symbiotic nitrogen fixation by *Lotus japonicus* containing an antisense b-1,3-glucanase gene. *Plant Biotechnology* 25: 357-360
- Tallan, H.H., Moore, S. and Stein, W.H. (1958) L- cystathionine in human brain. *J Biol Chem.* 230: 707-716
- Taller, B.J. and Wong, T.Y. (1989) Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 266-267
- Tchan, Y.T., Zeman, A.M. and Kennedy, I.R. (1991) Nitrogen fixation in para-nodules of wheat roots by introduced free-living diazotrophs. *Plant and Soil* 137: 43-47
- Terashima, I. and Evans, J.R. (1988) Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiology* 29: 143-155
- Tevini, M. (1971) Einfluss von Phosphat- und Nitratmangel auf die Synthese der Phospho- und Glykolipide bei *Impatiens balsamina*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 84: 595-606
- Tevini, M. and Steinmüller, D. (1985) Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta* 163: 91-96
- Thorpe, T.A. and Meier, D.D. (1972) Starch metabolism, respiration and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* 29: 121-124
- Tilman, T., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. and Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677
- Timsina, J., and Connor, D.J. (2001) Productivity and management of rice-wheat cropping systems: issues and challenges. *Field Crops Research* 69: 93-132
- Toonen, M.A.J., Hendricks, T., Schmidt, E.D.L., Verhoeven, H.A., van Kammen, A. and de Vries, S.C. (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194: 565-572
- Valverde, A., Velázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A. and Igual, J.M. (2003) *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated

with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1979–1983

van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindstrom, K. and Eardly, B.D. (2003) Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. Journal of Bacteriology 185: 2988–2998

Vance, C.P. and Graham, P.H. (1995) Nitrogen fixation in agriculture: application and perspectives. In Nitrogen fixation: Fundamentals and applications. Eds. A. Tikhonovich et al. pp. 77–86. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Varga, Sz.S., Korányi, P., Preininger, É., and Gyurján, I. (1994) Artificial associations between *Daucus* and nitrogen-fixing *Azotobacter* cells in vitro. Physiologia Plantarum 90: 786–790

Vasil, V., Vasil, I.K., Zuberer, D.A. and Hubbel, D.H. (1979) The biology of *Azospirillum*-sugarcane association. I. Establishment of the association. Z. Pflanzenphysiol. 95: 141–147

Venkatarayappa, T., Fletcher, R.A. and Thompson, J.E. (1984) Retardation and reversal of senescence in bean leaves by benzyladenine and decapitation. Plant and Cell Physiology 25: 407–418

Verhoeven, A.S., Demming-Adams, B and Adams, W.W. (1997) Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. Plant Physiology 113: 817–824

Vidi, P.A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J.R., Csucs, G., Dormann, P., Kessler, F., and Brehelin, C. (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. J. Biol. Chem. 281: 11225–11234

Vogel, S.L., Frisch, H.L. and Gotham, I.J. (1978) Qualitative assay of dissolved amino acids and sugars excreted by *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) and *Euglena gracilis* (Euglenophyceae). Journal of Phycology 14: 403–406

Voigt J. and Münzner P. (1994) Blue lightinduced lethality of a cell wall-deficient mutant of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Physiol. 35: 99–106

Wada, K., Kamisaki, Y., Kitano, M., Nakamoto, K. and Itoh, T. (1995) Protective effect of cystathionine on acute gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. Eur. J. Pharmacol. 294: 377–382

Wan, Y. and Lemaux, P.G. (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol. 104: 37–48

Wang, D., Wergin, W.P. and Zimmerman, R.H. (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry In: Hortscience 19: 71–72

Wang, T.L., Thompson, A.G and Horgan, R. (1977) A cytokinin glucoside from the leaves of *Phaseolus vulgaris*. Planta 135: 285–288

Wang, Z.T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S. and Goodenough, U. (2009) Algal lipid bodies: Stress induction, purification and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 8: 1856-1868

Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H. and Tanaka, H. (2005) Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 187-196

Webster, G., Gough, C., Vasse, J., Batchelor, C.A., O'Callaghan, K.J., Kothari, S.L., Davey, M.R., Dénarié, J. and Cocking, E. C. (1997) Interactions of rhizobia and wheat. *Plant and Soil* 194: 115-122

White, A.R., Huang, X.D., Jobling, M.F., Barrow, C.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I. and Cappai, R.(2001) Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J. Neurochem.* 76: 1509-1520

Xie, C. H. and Yokota, A. (2005) *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1435-1438

Yamada, T. and Sakaguchi, K. (1980) Nitrogen fixation associated with a hot spring green alga. *Arch. Microbiol.* 124: 161-167

Yamamoto, Y., Kinoshita, Y. and Yoshimura, I. (2002) Culture of thallus fragments and redifferentiation of lichens. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 34-46

Yamamoto, Y., Mizuguchi, R. and Yamada, Y. (1985) Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalinasudae* and production of usnic acid in their cultures.- *Agric. Biol. Chem.* 49: 3347-3348

Yoo, I. D., Fujii, T., Sano, Y., Komagata, K., Yoneyama, T., Iyama, S. and Hirota, Y. (1986) Dinitrogen fixation of rice-*Klebsiella* associations. *Crop Sci.* 26: 297-301

You, C., and Zhou, F. (1989) Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 35: 403-408

Young, P. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey G, Burris RH, Evans HJ (eds) *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall Inc, New York, pp 43-86

Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., and van Wijk, K.J. (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol* 140: 984-997

Zavaleta-Mancera, H.A., Franklin, K.A., Ougham, H., Thomas, H. and Scott, I.M (1999a) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1677-1682

Zavaleta-Mancera, Thomas, B.J., Thomas, H. and Scott, I.M (1999b) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. Journal of Experimental Botany, 50: 1683-1689

Zelenin, A.V., Titomirov, A.V. and Kolesnikov, V.A. (1989) Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection. FEBS Lett. 244: 65-67

Zhang, X., Zhao, H., Zhang, J. and Li, Z. (2004) Growth of *Azotobacter vinelandii* in a solid-state fermentation of technical lignin. Bioresource Technology 95: 31–33

Zhukova, T.S., Vladimirova, M.G., Klyachko-Gurvich, G.L. and Kurnosova, T.A. (1969) Comparative characteristics of growth and biosynthesis direction in various *Chlorella* strains under nitrogen deficiency: II. The biosynthesis of carbohydrates and lipids. . Fiziol. Rast. 16: 96